

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALEXANDRE MENNA BARRETO CORDEIRO

FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS GENES *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DRB1* EM CRIANÇAS  
COM TUMOR DO CÓRTEX ADRENAL PORTADORAS DA MUTAÇÃO R337H NO  
GENE *TP53*

CURITIBA

2011

**ALEXANDRE MENNA BARRETO CORDEIRO**

**FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS GENES *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DRB1* EM CRIANÇAS  
COM TUMOR DO CÓRTEX ADRENAL PORTADORAS DA MUTAÇÃO R337H NO  
GENE *TP53***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Pediatria, com área de concentração em Endocrinologia Pediátrica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz de Lacerda Filho  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria da Graça Bicalho

**CURITIBA  
2011**

*Ao Pedro, meu melhor amigo, que  
desde a sua chegada trouxe-nos  
todas as alegrias possíveis e que,  
absolutamente, enriquece nossa  
vida diariamente com seu carinho,  
companheirismo e amor.*

*À Mariana, guerreira nessa e em  
todas as várias batalhas que já  
enfrentamos, agradeço o amor  
incondicional, carinho e paciência.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, Alcione, que sempre acreditou em mim e, apesar da distância, continua sendo meu exemplo de integridade, honestidade e luta.

Ao meu pai, Cesinha, pelos ensinamentos de vida e... de informática.

Aos meus irmãos, Maurício, Cristiano e Andrea, por todo o apoio e confiança, além dos exemplos de vida que são.

Ao Pedro e Rosilda, meus pais curitibanos, que me acolheram como a um filho, obrigado pelo amor, carinho e paciência.

Ao Professor Luiz de Lacerda Filho, orientador dessa dissertação, pela oportunidade de aprendizado contínuo, energia em sempre procurar respostas e por seu espírito sempre jovem, um exemplo não apenas de profissionalismo, mas de pessoa.

À Professora Maria da Graça Bicalho, co-orientadora, pelo apoio, ensinamentos de genética e o carinho.

À Professora Rosana Marques Pereira, que acreditou em mim e me confiou os pacientes por quem tem tanto carinho e cuidado.

À Professora Margaret Cristina da Silva Boguszewski, pela amizade, carinho e apoio durante a minha formação.

Aos amigos da endocrinologia pediátrica, Rodrigo Bruel da Silveira, Juliana Rojas Ramos, Lucianna Machado Thá, Letícia Reis, Ellen Lara, entre muitos que fizemos durante essa jornada.

Aos amigos do LIGH, que me receberam com carinho e paciência durante todo o período em que passei no laboratório, obrigado pelos ensinamentos: Fabiana, Marina, Alessandro, Sibelle, Priscila, Cláudia, Fabíola, José Luis, Paulo, Sônia, aos demais que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço especialmente à Gorete e a Patrícia, grandes amigas e professoras, responsáveis não só pela etapa prática, como em toda a execução do estudo.

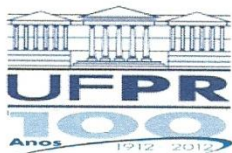
Ao Márcio, pela imensa ajuda na análise estatística, escrita e pelo convívio em várias tardes na fase final da pesquisa, grande amigo.

À equipe de enfermagem da Unidade de Endocrinologia Pediátrica Mariângela, Rose, Arianne, Terezinha, Ivone, Dirce e Lourdes, pela inestimável ajuda nas coletas e pelo carinho e amor aos pacientes.

Às secretárias da Unidade de Endocrinologia Pediátrica, em especial à Neuza e Verinha, grandes irmãs nesses longos anos de convívio.

À assistente social Andréia Lara, que é um exemplo de empatia e amor ao próximo.

Às crianças e suas famílias, que são a grande razão desta pesquisa.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA

*Programa de Pós-Graduação Mestrado e Doutorado  
em Saúde da Criança e do Adolescente*

## *Parecer*

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO -  
MESTRADO E DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE, do

Setor de Ciências Saúde, da Universidade Federal do Paraná, após arguir o Mestrando

*Alexandre Menna Barreto Cordeiro*

em relação ao seu trabalho de Dissertação intitulada

*“Frequência Alélica dos Genes HLA-A, HLA-B, HLA-  
DRB1 em Crianças Com Tumor do Córtex Adrenal  
Portadoras da Mutação R337H no Gene TP53”*

é de parecer favorável à *Aprovação* do aluno, habilitando-o ao título de  
*Mestre em Saúde da Criança e do Adolescente*,  
área de concentração em *Endocrinologia Pediátrica*.

Curitiba, 08 de dezembro de 2011

*Luiz de Lacerda Filho*  
UFPR-UEP, Orientador e Presidente da Banca Examinadora

*Sonir Roberto Rauber Antonini*  
FMR-USP, Primeiro Examinador

*Maria da Graça Bicalho*  
UFPR, Segunda Examinadora

*Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro*  
UFPR, Segunda Examinadora

*Rosana Marques Pereira*  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
Mestrado e Doutorado em Saúde da Criança e do Adolescente

## RESUMO

Aproximadamente 90% das crianças e adolescentes com tumor do córtex adrenal (TCA), no estado do Paraná, são portadoras da mutação germinativa R337H no gene *TP53*. Não existem evidências de que apenas a presença da mutação seja suficiente para o desenvolvimento do TCA. Associação entre o sistema *HLA* e doenças neoplásicas como osteossarcoma, leucemia e doença de Hodgkin foi documentada. Estudos mostram redução da expressão dos antígenos do MHC de classe II no TCA. Este estudo teve como objetivo avaliar a frequência alélica dos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* em pacientes com TCA, portadores da mutação R337H no gene *TP53*, e comparar os resultados com familiares saudáveis portadores da mesma mutação e com a população controle (doadores de medula óssea). Foram avaliadas as frequências alélicas de 45 pacientes com TCA em acompanhamento na Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UFPR. Os dados obtidos foram comparados com as frequências alélicas de uma população controle de 64.219 indivíduos adultos normais, doadores de medula óssea e de 47 familiares dos pacientes. Cinco pacientes negativos para a mutação R337H no gene *TP53* e 1 com genotipagem ambígua foram excluídos da análise estatística. Dos 39 pacientes, 26 são do sexo feminino, com uma relação F:M de 2:1. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 26 meses e a mediana de tempo de doença (período entre início dos sintomas e diagnóstico) foi de 6 meses. A forma clínica mais frequente foi a síndrome virilizante (48,7%), seguida da forma mista (síndrome virilizante associada à síndrome de Cushing), em 41% dos pacientes. O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma (87%); os estadios I-II foram mais frequentes (79,5%) do que os estadios III-IV (20,5%). As variantes alélicas *HLA-A\*31*, *HLA-B\*14*, *HLA-B\*39* e *HLA-DRB1\*08* apresentaram frequência maior nos pacientes do que na população controle. Quando analisados em relação ao estadiamento, os grupos alélicos *HLA-A\*68*, *HLA-B\*39* e *HLA-DRB1\*08* também mostraram frequência maior nos pacientes com estadio I-II em relação aos controles. Quanto à histologia, observou-se que nos pacientes com carcinoma as variantes *HLA-A\*31*, *HLA-A\*68* e *HLA-B\*39* são mais frequentes do que na população controle. Os dados deste estudo sugerem haver uma associação entre o desenvolvimento do TCA em crianças e adolescentes portadoras da mutação germinativa R337H no gene *TP53* e o sistema *HLA*.

**Palavras-chave:** Tumor do córtex adrenal. Infância. *TP53*. MHC. *HLA*.

## ABSTRACT

Near 90% of children and adolescents with adrenocortical tumor (ACT) in the State of Paraná are carriers of the germline mutation R337H in the *TP53* gene. It appears that the presence of the mutation per se is not sufficient to trigger the tumor appearance. Close association of certain types of malignancies, such as osteosarcoma, leukemia and Hodgkin's disease, and the HLA system has been documented. Recent studies have shown the reduced expression of Class II MHC complex in adrenocortical carcinomas. The aims of this study was to evaluate the allelic frequency of the *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* genes in patients with ACT, carriers of the R337H germline mutation of the *TP53* gene, and compare these results with the control population and the families, carriers of the same mutation. Allelic frequency of *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* genes were evaluated in 45 patients with ACT, on regular follow-up at the Pediatric Endocrine Unit of the Federal University of Paraná School Hospital. Patient's data were compared with *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* genes allelic frequency of a control population of 64,219 normal adult bone marrow donors and 47 patient's family. Five patients tested negative for the mutation R337H in *TP53* gene and one had ambiguous genotyping, being excluded of the statistical analysis. Of the remaining thirty-nine patients, 26 were females (female to male ratio 2:1); The median of age at diagnosis was 26 months and the median of disease duration (period between onset of symptoms and diagnosis) was 6 months. Pure virilizing syndrome (VS) was the most common clinical presentation (48.7%), and the mixed form, VS combined with hypercortisolism was present in 41% of the patients. Carcinoma was the most frequent histological variant (87%); tumor staging showed stages I and II comprehending 79.5% of the cases; the 20.5% remaining cases were stages III and IV. Allelic variants *HLA-A\*31*, *HLA-B\*14*, *HLA-B\*39* e *HLA-DRB1\*08* were significantly more frequent among patients than in control population. Regarding tumor staging, allelic groups *HLA-A\*68*, *HLA-B\*39* e *HLA-DRB1\*08* were more frequent in patients with stages I and II than in control population, whereas as far as histology, in patients with carcinoma the *HLA-A\*31*, *HLA-A\*68* e *HLA-B\*39* allelic variants were significantly more frequent than in control population. It is hypothesized that an association between ACT development in children and adolescents with the *TP53* gene germline mutation R337H and the *HLA* system might exist.

**Keyword:** Adrenocortical tumor. Children. *TP53*. MHC. HLA.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| FIGURA 1 -  | MAPA DO MHC HUMANO.....   | 26 |
| FIGURA 2 -  | ESTRUTURA DA MOLÉCULA DO MHC CLASSE I .....                       | 28 |
| FIGURA 3 -  | ESTRUTURA DA MOLÉCULA DO MHC CLASSE II .....                      | 28 |
| GRÁFICO 1 - | DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM<br>O SEXO .....          | 37 |
| GRÁFICO 2 - | IDADE DOS PACIENTES AO DIAGNÓSTICO DO TCA .....                   | 37 |
| GRÁFICO 3 - | TEMPO ENTRE O INÍCIO DOS SINTOMAS E<br>O DIAGNÓSTICO DO TCA.....  | 38 |
| GRÁFICO 4 - | DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM A<br>FORMA CLÍNICA ..... | 38 |
| GRÁFICO 5 - | DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES POR ESTADIAMENTO.....                  | 39 |
| GRÁFICO 6 - | DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM<br>A HISTOLOGIA.....     | 39 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| QUADRO 1 - ESTADIAMENTO DO TCA EM CRIANÇAS .....                   | 19 |
| QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS DAS MOLÉCULAS HLA DE CLASSE I E II..... | 27 |
| QUADRO 3 - VALORES PARA CÁLCULO DE <i>ODDS RATIO</i> .....         | 35 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS 39 PACIENTES COM TUMOR DO CÓRTEX ADRENAL .....   | 36 |
| TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA-A</i> NOS PACIENTES COM TCA, ANALISADOS POR ESTADIAMENTO E HISTOLOGIA, NOS FAMILIARES E NA POPULAÇÃO CONTROLE. ....     | 40 |
| TABELA 3 - COMPARAÇÃO DOS ALELOS DO <i>HLA-A</i> DOS PACIENTES, DO ESTADIO E DA HISTOLOGIA DO TUMOR EM RELAÇÃO À POPULAÇÃO CONTROLE .....  | 42 |
| TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA-B</i> NOS PACIENTES COM TCA, ANALISADOS POR ESTADIAMENTO E HISTOLOGIA, NOS FAMILIARES E NA POPULAÇÃO CONTROLE. ....     | 43 |
| TABELA 5 - COMPARAÇÃO DOS ALELOS DO <i>HLA-B</i> DOS PACIENTES, DO ESTADIO E DA HISTOLOGIA DO TUMOR E DOS FAMILIARES (R337H <i>TP53</i> ) EM RELAÇÃO À POPULAÇÃO CONTROLE .....    | 45 |
| TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO <i>HLA-DRB1</i> NOS PACIENTES COM TCA, ANALISADOS POR ESTADIAMENTO E HISTOLOGIA, NOS FAMILIARES E NA POPULAÇÃO CONTROLE. ....  | 46 |
| TABELA 7 - COMPARAÇÃO DOS ALELOS DO <i>HLA-DRB1</i> DOS PACIENTES, DO ESTADIO E DA HISTOLOGIA DO TUMOR E DOS FAMILIARES (R337H <i>TP53</i> ) EM RELAÇÃO À POPULAÇÃO CONTROLE ..... | 47 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|        |   |
|--------|---|
| DHEA-S | - Sulfato de dehidroepiandrosterona   |
| DNA    | - <i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucléico)                                  |
| Fabs   | - Frequência absoluta   |
| Frel   | - Frequência relativa   |
| HLA    | - <i>Human leucocyte antigen</i> (antígeno leucocitário humano)                             |
| IGF-II | - <i>Insulin-like growth factor II</i> (fator de crescimento semelhante à insulina II)      |
| LIGH   | - Laboratório de imunogenética e histocompatibilidade                                       |
| MHC    | - <i>Major histocompatibility complex</i> (complexo maior de histocompatibilidade)          |
| NF     | - Tumor não funcional   |
| PCR    | - <i>Polimerase chain reaction</i> (reação em cadeia de polimerase)                         |
| PET    | - Tomografia por emissão de pósitrons   |
| RNM    | - Ressonância nuclear magnética   |
| SC     | - Síndrome de Cushing   |
| SLF    | - Síndrome de Li-Fraumeni   |
| SM     | - Síndrome mista  |
| SSO    | - <i>Sequence specific oligonucleotide</i> (sonda de oligonucleotídeo sequência específica) |
| SV     | - Síndrome virilizante  |
| TC     | - Tomografia computadorizada  |
| TCA    | - Tumor do córtex adrenal   |
| UEP    | - Unidade de Endocrinologia Pediátrica  |
| UFPR   | - Universidade Federal do Paraná  |
| US     | - Ultrassonografia  |
| vs     | - <i>versus</i>   |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                         | 14 |
| 1.1 OBJETIVOS                               | 15 |
| 1.1.1 Objetivo primário                     | 15 |
| 1.1.2 Objetivos secundários                 | 15 |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>              | 16 |
| 2.1 TUMOR DO CÓRTEX ADRENAL                 | 16 |
| 2.1.1 Epidemiologia                         | 16 |
| 2.1.2 Manifestações clínicas                | 17 |
| 2.1.3 Estadiamento                          | 18 |
| 2.1.4 Diagnóstico laboratorial e por imagem | 19 |
| 2.1.5 Histologia                            | 20 |
| 2.1.6 Tratamento                            | 20 |
| 2.1.7 Prognóstico                           | 21 |
| 2.1.8 Etiologia                             | 22 |
| 2.1.8.1 IGF-II                              | 23 |
| 2.1.8.2 SF-1                                | 23 |
| 2.1.8.3 $\beta$ -catenina                   | 24 |
| 2.1.8.4 FGF-2                               | 24 |
| 2.1.8.5 O gene <i>TP53</i>                  | 25 |
| 2.2 O MHC HUMANO                            | 26 |
| 2.3 O HLA E A ADRENAL                       | 29 |
| <b>3 CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>               | 31 |
| 3.1 MODELO DO ESTUDO                        | 31 |
| 3.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO                | 31 |
| 3.3 CONCENTRAÇÃO DO DNA                     | 32 |
| 3.4 TIPAGEM DOS GENES <i>HLA</i>            | 32 |
| 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA                     | 34 |
| 3.5.1 Frequências alélicas e genotípicas    | 34 |
| <b>4 RESULTADOS</b>                         | 36 |
| 4.1 HLA-A                                   | 40 |
| 4.1.1 Pacientes vs população controle       | 41 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 4.1.2    | Estadio do tumor vs população controle.....                       | 41 |
| 4.1.3    | Histologia do tumor vs população controle .....                   | 41 |
| 4.2      | HLA-B .....   | 43 |
| 4.2.1    | Pacientes vs população controle .....                             | 44 |
| 4.2.2    | Estadio do tumor vs população controle.....                       | 44 |
| 4.2.3    | Histologia do tumor vs população controle .....                   | 44 |
| 4.2.4    | Familiares (R337H <i>TP53</i> ) vs população controle .....       | 44 |
| 4.3      | HLA-DRB1 .....  | 45 |
| 4.3.1    | Pacientes vs população controle .....                             | 46 |
| 4.3.2    | Estadio do tumor vs população controle.....                       | 46 |
| 4.3.3    | Histologia do tumor vs população controle .....                   | 47 |
| 4.3.4    | Familiares (R337H <i>TP53</i> ) vs população controle .....       | 47 |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | 48 |
| 5.1      | A MUTAÇÃO NO GENE <i>TP53</i> E O TCA .....                       | 48 |
| 5.2      | HLA.....  | 49 |
| 5.2.1    | HLA-A.....  | 50 |
| 5.2.2    | HLA-B.....  | 50 |
| 5.2.3    | HLA-DRB1 .....  | 51 |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 52 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 53 |
|          | <b>ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM</b>         |    |
|          | <b>PESQUISA EM SERES HUMANOS</b> .....                            | 64 |
|          | <b>ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> ..... | 66 |

## 1 INTRODUÇÃO

Os tumores do córtex adrenal (TCA) na infância são extremamente raros, porém a sua prevalência nas regiões Sul e Sudeste do Brasil é aproximadamente quinze vezes maior do que a mundial (SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997; PIANOVSKI *et al.*, 2006).

O TCA ocorre com maior frequência em meninas com idade inferior a cinco anos, apresentando-se mais comumente com quadro de virilização (MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2006).

O estadiamento clínico, baseado no tamanho do tumor e na presença ou não de metástases ao diagnóstico, é até o presente momento o principal critério utilizado para estabelecer o prognóstico dos pacientes com TCA (WEISS, 1984; WEISS; MEDEIROS; VICKERY JR., 1989). Em relação à histologia, há controvérsias quanto à confiabilidade em se diferenciar os adenomas dos carcinomas adrenocorticais (BUGG *et al.*, 1994; JAIN *et al.*, 2010).

O tratamento definitivo é a cirurgia com ressecção total da lesão, sendo que o tamanho do tumor possui correlação negativa com o prognóstico (MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2006; ABIVEN *et al.*, 2006).

Em mais de 95% dos pacientes com TCA no estado do Paraná está presente a mutação germinativa R337H no gene *TP53* (RIBEIRO *et al.*, 2001). A mesma mutação também é encontrada em indivíduos saudáveis, familiares de crianças com TCA (FIGUEIREDO *et al.*, 2006), sugerindo que outros fatores podem influenciar no desenvolvimento do TCA.

Estudos avaliaram a presença de antígenos do MHC (*major histocompatibility complex*) nos TCA, apesar de ainda não ter sido estabelecida uma relação clara entre o sistema imune e o endócrino no que concerne ao TCA (MARX *et al.*, 1996). Nesse estudo, encontrou-se associação entre alguns alelos do sistema HLA (*Human Leucocyte Antigen*) e maior risco de malignidade do carcinoma do córtex adrenal em adultos. West *et al.* (2007) encontraram redução da expressão de antígenos classe II em carcinomas adrenais, quando comparados aos adenomas.

A associação entre o sistema HLA e o desenvolvimento de mais de 40 doenças têm sido sugerida em estudos populacionais (GHODKE *et al.*, 2005). Pesquisadores demonstraram associação positiva entre alelos e antígenos do MHC,

conferindo suscetibilidade à doença de Hodgkin (KLITZ *et al.*, 1994), à leucemia (BARION *et al.*, 2007) e ao osteossarcoma (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Indivíduos com a mutação germinativa R337H no gene *TP53* desenvolvem ou não o tumor adrenocortical e, entre os que o desenvolve, o curso evolutivo da doença varia amplamente.

Não há até o momento nenhum estudo mostrando associação entre perfil dos genes *HLA* classe I (*HLA-A*, *HLA-B*) e o desenvolvimento do TCA na infância. Apenas um autor relatou uma prevalência maior de uma variante classe II (*DRB1\*01*) em carcinomas adrenais (WOLKERSDÖRFER *et al.*, 2005).

Na tentativa de identificar fatores que possam influenciar no desenvolvimento do TCA, o presente estudo pretendeu investigar se existe associação entre os grupos alélicos *HLA* e o desenvolvimento do TCA na infância.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo primário

Determinar as frequências dos grupos alélicos dos genes *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DRB1* nos pacientes com tumor do córtex adrenal portadores da mutação R337H no gene *TP53*.

### 1.1.2 Objetivos secundários

Comparar:

- As frequências dos grupos alélicos observadas no grupo dos pacientes e dos seus familiares saudáveis portadores da mutação R337H no gene *TP53*, com os dados de frequências alélicas de uma população saudável, doadores voluntários de medula óssea.
- As frequências alélicas dos pacientes, de acordo com o estadiamento e a histologia do tumor.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 TUMOR DO CÓRTEX ADRENAL

#### 2.1.1 Epidemiologia

Os tumores do córtex adrenal são raros na infância e adolescência, com uma incidência até dez vezes menor do que nos adultos. Dados do *Surveillance Epidemiology End Results* (SEER), nos Estados Unidos, indicam até 14 casos novos de TCA, anualmente, em jovens abaixo dos vinte anos, sendo que os TCA representam 1,3% dos carcinomas nessa faixa etária (BERNSTEIN; GURNEY, 1999).

Apesar da sua raridade, a frequência do TCA nas regiões sul e sudeste do Brasil é de aproximadamente 3,4-4,2 casos/1.000.000 (SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997), 12-18 vezes maior do que no resto do mundo (PIANOVSKI *et al.*, 2006).

O TCA ocorre em todas as idades e tem um padrão de distribuição bimodal, com um pico de incidência ao redor dos cinco anos e outro por volta da quarta e quinta décadas (WOOTEN; KING, 1993). Na infância também apresenta dois picos de incidência, um até os três anos e o segundo na adolescência (RIBEIRO *et al.*, 1990).

O TCA na infância apresenta características clínicas e biológicas peculiares também quando comparado a outras neoplasias comuns nesta faixa etária. Enquanto a incidência da maioria dos carcinomas da infância aumenta com a idade, aproximadamente 65% dos tumores adrenais ocorrem antes dos cinco anos (RIBEIRO *et al.*, 2000; MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2006).

O sexo feminino é acometido com maior frequência, com uma relação de 5,3:1 nos casos até os 4 anos. Essa relação praticamente se iguala quando são avaliados os casos em crianças acima dos 4 anos (SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997; MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2006).

Wajchenberg *et al.* (2000), sugeriram maior suscetibilidade de desenvolvimento da doença em brancos, ao avaliar 47 crianças com TCA.

Poucos autores relatam predomínio de localização à direita ou à esquerda (WOOTEN; KING, 1993), mas a maioria não observa esta diferença. Tumores

bilaterais são raros (WOOTEN; KING, 1993; RIBEIRO *et al.*, 2000) e representam de 2 a 10% dos casos (CIFTCI *et al.*, 2001). Marques-Pereira *et al.* (2004) não encontraram nenhum tumor bilateral entre 125 pacientes e as glândulas direita e esquerda foram afetadas em proporções semelhantes.

### 2.1.2 Manifestações clínicas

Os tumores adrenocorticais classificam-se em funcionais, quando a produção hormonal determina consequências clínicas; e não funcionais, quando não há secreção de hormônios pelo tumor ou a secreção é insuficiente para produzir manifestações clínicas.

Na infância, a maioria dos tumores é funcional, enquanto que após os trinta anos de idade predominam os casos de tumores não funcionais (WOOTEN; KING, 1993). Além disso, os TCA na infância apresentam características clínicas e histológicas distintas em relação ao tumor em adultos (WIENEKE; THOMPSON; HEFFESS, 2003).

Apesar das diferenças geográficas quanto à incidência do TCA na infância, as características clínicas do tumor, nas casuísticas brasileiras, americanas e europeias, são semelhantes àsquelas dos pacientes avaliados em Curitiba (WAJCHENBERG *et al.*, 2000; MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2004).

Os principais sinais clínicos decorrem da hipersecreção dos androgênios pelo tumor, como hipertrofia de clitóris ou aumento no tamanho do pênis, voz grave, acne, hirsutismo, aumento da massa muscular, entre outros, conjunto este denominado síndrome virilizante (SV). A maioria das crianças apresenta aceleração da velocidade de crescimento e da maturação esquelética. Esta forma clínica é a mais comum, seguida da mista (SM), que é uma combinação de SV com síndrome de Cushing (SC).

Em uma minoria de pacientes, a SC, secundária à hipersecreção de cortisol e caracterizada pela hipertensão, pletora facial, ganho de peso e redução ou até parada do crescimento, é o quadro predominante.

Na Unidade de Endocrinologia Pediátrica (UEP) da Universidade Federal do Paraná foram atendidos, entre 1966 e 2005, 137 pacientes com diagnóstico de TCA. A maioria (72%) dos pacientes é do sexo feminino, com uma média de idade de 3,2 anos, sendo que dois terços tinham entre 0-4 anos, incluindo cinco casos de tumor

congenito. SV esteve presente em 51,2% dos casos, SM em 42,4% dos pacientes e apenas um caso de SC isolada. Tumores não funcionais perfizeram 4,8% dos casos (MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2006).

A hipertensão durante a evolução dos TCA está presente em mais de 50% dos pacientes, podendo levar à encefalopatia hipertensiva, principalmente nas síndromes mistas (SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997). De 22 crianças com SV, 17 apresentaram hipertensão na série de Wajchenberg *et al.* (2000). A hipertensão pode ser secundária à produção de mineralocorticóides, devido à ativação do sistema renina-angiotensina pela compressão da veia renal pelo tumor (WAJCHENBERG *et al.*, 2000) ou pela inibição da enzima 11 $\beta$ -hidroxilase pelo excesso de androgênios (GREENSPAN; STREWLER, 2000).

A presença de massa abdominal palpável é cada vez mais rara, provavelmente devido ao maior grau de suspeita e experiência dos pediatras na avaliação de crianças com quadro de pubarca, levando ao diagnóstico precoce.

A invasão da veia cava, com extensão até o átrio direito, é rara e geralmente associada aos tumores grandes e com maior tempo de evolução (MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2006).

### 2.1.3 Estadiamento

Em uma avaliação de 40 pacientes da UEP observou-se que, nos pacientes sem metástase ao diagnóstico, as características clínicas relacionadas a um pior prognóstico foram: idade maior ou igual a 3,5 anos, intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico maior do que 6 meses, volume do tumor maior ou igual a 200cm<sup>3</sup>, peso do tumor maior ou igual a 80 g e excreção urinária de 17-OH CS (17-hidroxi-corticosteróide) maior ou igual a 4mg/m<sup>2</sup>. Todavia, apenas o tamanho do tumor correlacionava-se negativamente com a sobrevida (RIBEIRO *et al.*, 1990).

A partir desses resultados, os autores propuseram um estadiamento (Quadro 1) para o TCA em crianças (SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997), que mostrou correlação negativa significativa com a sobrevida (MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2004; MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004).

| ESTADIO | DESCRIÇÃO  |
|---------|--|
| I       | Tumor totalmente ressecado, vol. < 200cm <sup>3</sup> , níveis hormonais normais após cirurgia   |
| II      | Tumor residual microscópico, vol. > 200cm <sup>3</sup> , ruptura da cápsula tumoral durante a cirurgia, níveis hormonais alterados após a cirurgia |
| III     | Tumor residual macroscópico ou inoperável  |
| IV      | Metástase à distância  |

QUADRO 1 - ESTADIAMENTO DO TCA EM CRIANÇAS

FONTE: Sandrini, Ribeiro e De Lacerda (1997)

#### 2.1.4 Diagnóstico laboratorial e por imagem

Não há um esteroide considerado como marcador universal do TCA, porém o sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) e a testosterona geralmente estão elevados na SV e o cortisol e o composto-S na forma mista (WAJCHENBERG *et al.*, 2000). Atualmente, o perfil hormonal na rotina da UEP inclui cortisol sérico (8:00 e 23:00), testosterona, DHEA-S, androstenediona, 17-hidroxi-progesterona, aldosterona e atividade de renina plasmática (MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2006).

A caracterização das lesões adrenais por métodos de imagem continua evoluindo a cada ano. Além da ultrassonografia (US), várias modalidades, como a tomografia computadorizada (TC) com contraste, ressonância nuclear magnética (RNM) e a tomografia por emissão de pósitrons (PET) isolada ou PET/TC têm sido utilizadas com o objetivo de tentar ajudar na diferenciação entre adenomas e carcinomas adrenais (BLAKE; CRONIN; BOLAND, 2010).

A US permite a identificação de massas adrenais na maioria dos casos. Obesidade e sobreposição gasosa dificultam a interpretação da US (ABRAMS *et al.*, 1982), que depende também da habilidade do operador.

A tomografia computadorizada geralmente é considerada o exame de escolha na avaliação de massas adrenais e presença de metástases. Por meio de técnicas de secção, podem ser identificados nódulos menores do que cinco milímetros (LEE *et al.*, 1991).

A RNM colabora com os métodos mais tradicionais devido a sua capacidade de identificar os tecidos de acordo com a intensidade de sinal. Os adenomas geralmente mostram captação uniforme do gadolínio (SEMELKA *et al.*, 1993), enquanto que os

carcinomas se apresentam com heterogeneidade de sinal, devido à presença de necrose e hemorragia (SCHLUND *et al.*, 1995).

#### 2.1.5 Histologia

A classificação do tumor baseado apenas na histologia tem suas limitações. O método mais utilizado para a avaliação é o de Weiss, que propôs a diferenciação entre adenomas e carcinomas adrenais baseado em nove parâmetros morfológicos. Os adenomas apresentam menos de dois critérios de Weiss, enquanto os carcinomas têm três ou mais (WEISS, 1984). Apesar de não ser um método desenvolvido e validado para aplicação no tumor adrenal pediátrico, um estudo recente mostrou acurácia ao comparar o prognóstico de pacientes com TCA baseando-se naquele critério. A taxa de sobrevida em cinco anos no grupo com escore menor ou igual a três foi de 100%, contra 0% nos pacientes com escore maior do que três (JAIN *et al.*, 2010).

Wieneke *et al.* (2003), após avaliar 83 pacientes com idade inferior a 20 anos, propôs uma classificação do TCA pediátrico em benigno, maligno e indeterminado, de acordo com um escore baseado em 9 parâmetros macroscópicos e microscópicos. O autor enfatizou que nenhuma das características pode ser avaliada isoladamente como sinal de malignidade e que o sistema não tem sensibilidade e especificidade suficientes quando se avalia um caso isolado.

#### 2.1.6 Tratamento

A ressecção completa do tumor, sem ruptura da cápsula tumoral, principalmente nos pacientes com estadios I e II é a terapêutica com maior índice de cura (WAJCHENBERG *et al.*, 2000; MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004).

A via de acesso usual é a laparotomia transperitoneal, possibilitando a ressecção do tumor e linfonodos retroperitoneais, além de permitir o inventário adequado da cavidade abdominal. A adrenalectomia laparoscópica se tornou o padrão ouro para o tratamento de lesões adrenais benignas em adultos (PRAGER *et al.*, 2004), porém a

aplicabilidade em crianças é mais limitada, devido ao tamanho das crianças, dos instrumentos e depende da necessidade de aquisição de experiência laparoscópica pelos cirurgiões pediátricos (SKARSGARD; ALBANESE, 2005). Há relato de caso de adrenalectomia retroperitoneoscópica em criança de 1,5 anos, com TCA, forma SV (TOBIAS-MACHADO *et al.*, 2002).

A ruptura da cápsula do tumor, com consequente extravasamento de células neoplásicas no leito cirúrgico ou na cavidade abdominal (*spillage*), pode ocorrer antes ou durante a cirurgia e aumenta o risco de recidiva, diminuindo significativamente a sobrevida (MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2004; 2006).

A quimioterapia não tem impacto no tempo de sobrevida. Apesar disso, quando não há ressecção completa do tumor e nos casos de lesões metastáticas, embora controverso, o tratamento adjuvante tem sido indicado. Os pacientes com TCA estádios III e IV são submetidos à cirurgia e quimioterapia (MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2004; 2006). O Mitotano (o,p'-DDD) parece ser o único agente farmacológico que tanto inibe a esteroidogênese quanto destrói as células adrenocorticais (WAJCHENBERG *et al.*, 2000). A primeira demonstração de que tumores funcionais e não funcionais *in vivo* respondem ao tratamento com mitotano foi feita por Bergenstal *et al.* em 1960 (WOOTEN; KING, 1993). As principais limitações ao seu uso são elevada toxicidade e frequência de efeitos adversos (DAFFARA *et al.*, 2008).

A associação do mitotano com a cisplatina, etoposídeo e doxorrubicina parece ser a melhor alternativa para o tratamento do carcinoma adrenal (ZANCANELLA *et al.*, 2006).

#### 2.1.7 Prognóstico

Devido à raridade do TCA e seu comportamento heterogêneo, torna-se um desafio estabelecer critérios prognósticos da doença. A importância prognóstica da histologia é controversa, principalmente para pacientes pediátricos (SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997). No estudo de Wieneke *et al.*, aproximadamente 90% dos TCA foram interpretados como malignos. No entanto, apenas 31% dessas lesões se comportaram clinicamente como tumores realmente malignos (WIENEKE; THOMPSON; HEFFESS, 2003).

As manifestações clínicas, o perfil hormonal, o tratamento cirúrgico e o estadiamento do tumor mostraram associação com a sobrevida enquanto o mesmo não se observou em relação à histopatologia do TCA (MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2006). Dados do *International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry* (IPATR), numa avaliação de 254 pacientes – 43,4% da UEP/UFPR – mostraram que o tamanho do tumor, SV isolada e idade menor do que quatro anos estiveram associados à maior probabilidade de remissão (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004). Avaliando 33 crianças, Sbragia *et al.* (2005) concluíram que os parâmetros clínicos e cirúrgicos são os principais fatores prognósticos no TCA, enquanto que os marcadores imunohistoquímicos não são bons preditores da evolução.

#### 2.1.8 Etiologia

Avanços recentes têm contribuído para a compreensão do processo de formação dos tumores adrenocorticais. A patogênese do TCA pode envolver múltiplas alterações moleculares, como inativação de genes supressores tumorais, aumento na expressão de IGF-II, entre outros. A variedade de anormalidades genéticas é responsável pela heterogeneidade fenotípica do TCA (WAJCHENBERG *et al.*, 2000).

A análise da clonalidade dos tumores e a hibridização genômica comparativa fornecem evidências de que o processo de tumorigênese é composto por várias etapas, em que uma célula normal torna-se adenomatosa e, posteriormente, maligna (BEUSCHLEIN *et al.*, 1994).

Monoclonalidade é o termo que descreve a progressão tumoral como resultado final de uma mutação genética intrínseca, enquanto que a policlonalidade sugere que as células tumorais podem ser afetadas por estímulo local ou sistêmico (LIBÈ; FRATTICCI; BERTHERAT, 2007). Os tumores monoclonais resultam de alterações moleculares que conferem uma vantagem de crescimento à célula inicialmente afetada, indicando a necessidade de alterações em *loci* específicos do genoma para a tumorigênese adrenal. Essas alterações levariam à inativação dos genes supressores de tumor e ativação dos oncogenes (LIBÈ; FRATTICCI; BERTHERAT, 2007). Os carcinomas adrenocorticais são tumores monoclonais, ao passo que os adenomas podem ser monoclonais ou policlonais (BEUSCHLEIN *et al.*, 1994).

#### 2.1.8.1 IGF-II

O gene *IGF-II* (*insulin-like growth factor II* – fator de crescimento semelhante à insulina II), localizado no cromossomo 11 (11p15), é responsável por codificar um importante fator de crescimento fetal (IGF-II). Devido ao *imprinting* materno, se expressa apenas através do alelo paterno (DECHIARA; ROBERTSON; EFSTRATIADIS, 1991).

Os IGFs (*insulin-like growth factors* – fatores de crescimento semelhantes à insulina) estão envolvidos no crescimento e desenvolvimento do córtex adrenal e seu papel no TCA está amplamente documentado (LOGIÉ *et al.*, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2008). Alterações na região de *imprinting* no cromossomo 11, com a perda do alelo materno e duplicação da cópia paterna, resultam na hiper-expressão do IGF-II, e associam-se a um maior risco de recorrência do TCA. Esses eventos são mais comuns nos carcinomas e correlacionam-se positivamente com o escore de Weiss (GICQUEL *et al.*, 2001).

#### 2.1.8.2 SF-1

O SF-1 (*steroidogenic factor 1* – fator esteroidogênico 1) é um membro órfão da família dos receptores nucleares dos fatores de transcrição e exerce um papel importante na função endócrina, que inclui a regulação das hidroxilases, o desenvolvimento e função do córtex adrenal e a diferenciação sexual masculina (PARKER; SHIMMER, 1997).

Através da hibridização *in situ* por fluorescência, um número elevado de cópias do gene *SF-1* foi detectado em oito de nove TCA diagnosticados em crianças brasileiras, sugerindo a associação entre a amplificação do *SF-1* e tumorigênese adrenal (FIGUEIREDO *et al.*, 2005). Em todos esses tumores foi identificada a hiper-expressão da proteína SF-1 (PIANOVSKI *et al.*, 2006).

Almeida *et al.* (2010), investigaram a expressão da proteína e a amplificação do gene *SF-1* em TCA de adultos e crianças. A frequência da hiper-expressão foi significativamente maior nos tumores em crianças do que em adultos. Além disso,



um número aumentado de cópias do *SF-1* foi identificado em 47% dos TCA pediátricos, enquanto nos tumores em adultos esse achado foi identificado em apenas 10%.

#### 2.1.8.3 $\beta$ -catenina

A via Wnt regula o desenvolvimento da adrenal normal e sua função, inclusive sua divisão em zonas e a esteroidogênese, normalmente sendo ativada durante a vida embrionária (SUWA *et al.*, 2003). A  $\beta$ -catenina é um componente chave desse processo. Alterações genéticas na via de sinalização Wnt foram identificadas na polipose adenomatosa familiar (KIKUCHI, 2003) e, posteriormente, em inúmeros outros cânceres. Além disso, pacientes com polipose adenomatosa familiar com mutações germinativas no gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*), que levam a uma ativação da sinalização, podem desenvolver TCA (BLAKER *et al.*, 2004).

Estudos de perfil gênico em vários tipos de TCA têm demonstrado frequente ativação de genes alvo da sinalização Wnt, com acúmulo de  $\beta$ -catenina tanto nos adenomas quanto nos carcinomas (LIBÈ; FRATTICCI; BERTHERAT, 2007).

Leal *et al.* (2011) demonstraram padrão de alteração na expressão de genes da via de sinalização Wnt em TCA na infância, com pior prognóstico nos pacientes portadores de mutação no gene *CTNNB1*.

#### 2.1.8.4 FGF-2

Vários fatores de crescimento auxiliam na regulação da função e crescimento da adrenal normal, como o FGF-2 (*fibroblastic growth factor 2* – fator de crescimento fibroblástico 2), o TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$*  – fator de crescimento transformador- $\alpha$ ), entre outros.

O FGF-2 parece ser o principal fator associado aos TCA, pois está altamente expresso nos tecidos adrenais, e é um dos mitógenos mais potentes em cultura celular de adrenais adultas e fetais (MESIANO *et al.*, 1991). O mesmo autor sugeriu um possível efeito mitogênico cooperativo entre o FGF-2 e o IGF-II.

#### 2.1.8.5 O gene *TP53*

O gene supressor tumoral *TP53*, localizado no cromossomo 17 (17p13), está diretamente envolvido no controle da proliferação celular e codifica a proteína p53.

A p53 é uma fosfoproteína com 53-kilodaltons, composta por vários domínios funcionais: os domínios de ativação 1 e 2, o domínio rico em prolina, uma sequência específica de ligação ao DNA, o sinal de localização nuclear, um domínio de tetramerização e o domínio básico C-terminal. É um fator de transcrição e sua ação está relacionada ao processo de supressão tumoral (LEVINE, 1997).

Na presença de dano celular ou sinais de hiperproliferação, a proteína supressora tumoral p53 é ativada, levando à parada no ciclo celular ou apoptose. Assim, a p53 monitora a integridade genômica e, quando necessário, ativa mecanismos de reparo do DNA ou elimina as células danificadas por meio da apoptose (DIGIAMMARINO *et al.*, 2002).

Mutações germinativas no *TP53* foram identificadas em até 70% das famílias com a Síndrome de Li-Fraumeni (SLF). Nas famílias com SLF, as mutações germinativas do *TP53* conferem susceptibilidade para carcinoma de mama, sarcoma de tecidos moles, osteossarcoma, leucemia e tumor do córtex adrenal (HISADA *et al.*, 1998). Quando as famílias apresentam-se com características incompletas para a síndrome, esta é denominada Síndrome de Li-Fraumeni *like* (SLF *like*). Ainda fazem parte do espectro tumoral os melanomas, tumores gonadais de células germinativas e os carcinomas de pulmão, pâncreas, próstata e sistema nervoso central. Crianças e adultos jovens constituem a maioria dos indivíduos afetados.

Uma substituição nucleotídica no éxon 10, levando à mutação "*missense*" R337H no domínio de tetramerização do *TP53* foi identificada na maioria dos indivíduos com TCA na região sul e sudeste do Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2001; LATRONICO *et al.*, 2001).

Rosati *et al.* (2008) sugerem que a tumorigênese no TCA em crianças positivas para a mutação R337H no *TP53* seja o resultado de múltiplos eventos desencadeados pela apoptose ineficaz associada a uma instabilidade genômica produzida pela mutação.

A perda da heterozigosidade (LOH) do cromossomo 17 possui forte correlação com o carcinoma adrenal (GICQUEL *et al.*, 2001), com frequência de até 85% e correlação positiva com o critério de Weiss.

## 2.2 O MHC HUMANO

A identificação do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) na espécie humana ocorreu na década de 50, por Dausset, Payne e van Rood (ABBAS; LICHTMAN, 2008). Essa descoberta foi resultado da investigação e constatação de que anticorpos presentes no soro de indivíduos politransfundidos ou no soro de múltiparas eram reativos a antígenos presentes em leucócitos. Na espécie humana, o MHC foi denominado *Human Leucocyte Antigen* – Antígenos Leucocitários Humanos – sendo comumente conhecido pela sigla HLA. Estudos genéticos relacionados a esses aloantígenos, bem como estudos sorológicos e moleculares, permitiram a identificação de vários *loci* gênicos polimórficos e polialélicos situados em uma região do braço curto do cromossomo 6 humano (6p21.31) (Figura 1).

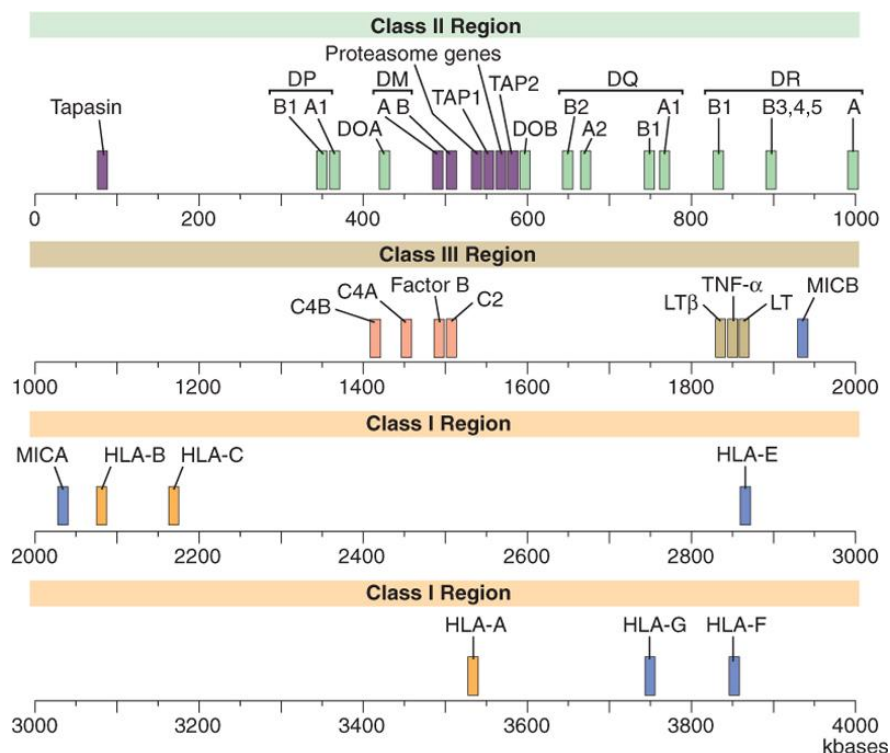


FIGURA 1 - MAPA DO MHC HUMANO  
FONTE: Abbas e Lichtman (2008)

Essa área do genoma foi subdividida em regiões de classe I, II e III (LAMM; OLAISEN, 1985; BELL, 1989) de acordo com a estrutura e função dos produtos dos genes nela situados. Outros *loci* gênicos estão presentes na região do MHC, mas não estão relacionados à função apresentadora de peptídeos para linfócitos T, um dos atributos das proteínas codificadas pelos genes *HLA* de classe I e II e, não são determinantes de histocompatibilidade ou resposta imune adaptativa. Nessa região do genoma existem genes que codificam produtos moleculares que também participam de funções imunes e não imunes, como por exemplo os genes *TNF* e *CYP21*, respectivamente. O *CYP21* está associado com a hiperplasia adrenal congênita, secundária à deficiência de 21-hidroxilase (ABBAS; LICHTMAN, 2008).

A proteína HLA é ancorada à membrana celular pela região transmembrana e projeta-se para o interior da célula por meio da região citoplasmática. Cada molécula HLA estrutura-se a partir de dois polipeptídeos codificados por genes diferentes, sendo que uma importante região funcional da proteína HLA é uma fenda situada na região extracelular. Essa região se liga a peptídeos protéicos que serão apresentados aos linfócitos T. Domínios funcionais semelhantes àqueles presentes nas imunoglobulinas permitem que proteínas HLA sejam classificadas com membros da Superfamília das Imunoglobulinas.

As proteínas de classe I são heterodímeros constituídos de uma cadeia polipeptídica  $\alpha$  composta por três domínios ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_3$ ) ligada de forma não covalente a um polipeptídeo menor, denominado  $\beta_2$ -microglobulina, não codificado pelo *HLA*. Proteínas de classe II são heterodímeros formados por uma cadeia  $\alpha$ , com dois domínios ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ), e uma cadeia  $\beta$ , também com dois domínios ( $\beta_1$  e  $\beta_2$ ) (ABBAS; LICHTMAN, 2008). Suas características e diferenças estão representadas no quadro 2 e figuras 2 e 3.

| CARACTERÍSTICA                                      | HLA CLASSE I  | HLA CLASSE II                                      |
|---|---|--|
| Cadeias polipeptídicas                              | $\alpha$ (44-47 kD) $\beta_2$ -microglobulina (12 kD) | $\alpha$ (32-34 kD) $\beta$ (29-32 kD)             |
| Localização de resíduos de aminoácidos polimórficos | Domínios $\alpha_1$ e $\alpha_2$                      | Domínios $\beta_1$ e $\beta_2$                     |
| Local de ligação para co-receptores da célula T     | A região $\alpha_3$ liga CD8 (de linfócitos T CD8+)   | A região $\beta_2$ liga CD4 (de linfócitos T CD4+) |
| Tamanho da fenda de ligação de peptídeos            | Acomoda peptídeos com 8-11 aminoácidos                | Acomoda peptídeos com 10-30 aminoácidos            |
| <i>Locus</i>  | <i>HLA-A, HLA-B, HLA-C</i>                            | <i>HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP</i>                      |

QUADRO 2 - Características das moléculas HLA de classe I e II  
FONTE: Abbas e Lichtman (2008)

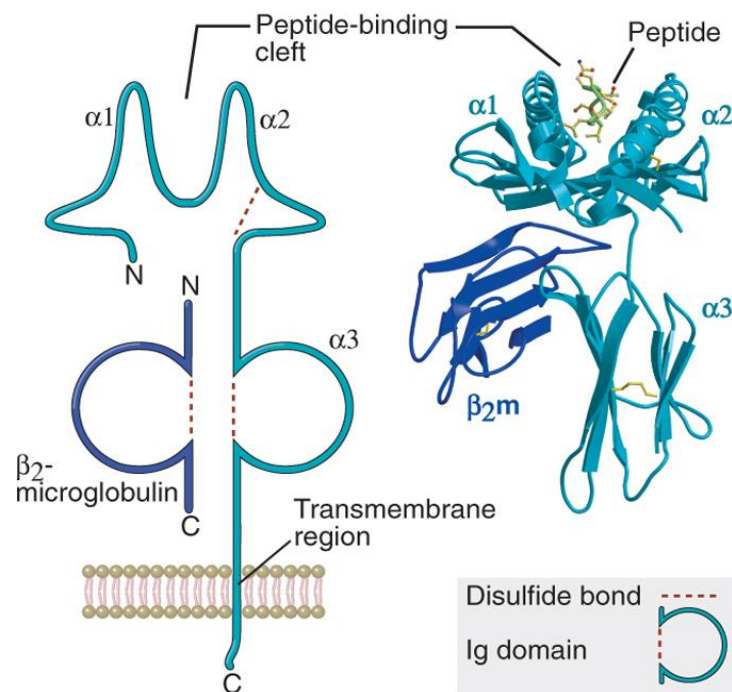


FIGURA 2 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA DO MHC CLASSE I  
 FONTE: Abbas e Lichtman (2008)

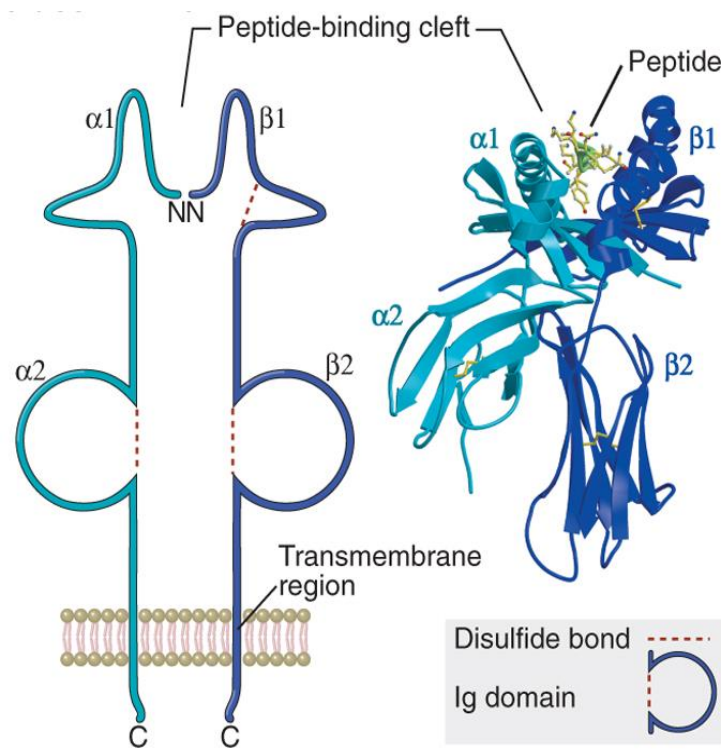


FIGURA 3 - ESTRUTURA DA MOLÉCULA DO MHC CLASSE II  
 FONTE: Abbas e Lichtman (2008)

A descoberta deste sistema de histocompatibilidade foi um grande avanço para a expansão e compreensão dos transplantes de órgãos e tecidos.

Em humanos, os genes *HLA* codificam proteínas que auxiliam no processo de imunomodulação e no reconhecimento do próprio e do não próprio (células e tecidos) por células do sistema imune. A principal função dessas células é apresentar antígenos estranhos aos linfócitos T auxiliares (CD4+) e citotóxicos (CD8+).

O *HLA* está envolvido no desenvolvimento de diversas doenças e neoplasias, como leucemia, osteossarcoma e linfoma de Hodgkin (GHODKE *et al.*, 2005; CAILLAT-ZUCMAN, 2008). A associação entre alelos *HLA* e determinada doença pode ser quantificada através da comparação da tipificação dos alelos expressos pelos indivíduos com a doença e dos alelos da população geral.

Há evidências de que alterações no sistema *HLA* conferem maior susceptibilidade para o desenvolvimento de certas doenças, bem como na gravidade de suas apresentações.

Em um estudo de frequência haplotípica, Klitz *et al.* (1994) encontraram alelos de classe II que conferem susceptibilidade ao linfoma de Hodgkin. Oliveira *et al.* (2007), observaram um polimorfismo no gene *TNF- $\beta$*  que leva a uma produção maior de citocinas e pode ser um mecanismo de facilitação na progressão do osteossarcoma, piorando o prognóstico da doença. Em outro estudo populacional, Barion *et al.* (2007) demonstraram associação de alelos do *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1* em vários tipos de leucemias.

## 2.3 O HLA E A ADRENAL

O córtex adrenal é responsável pela síntese dos esteroides – glicocorticoides, mineralocorticoides e androgênios – que regulam vários processos biológicos, como a pressão arterial, metabolismo da glicose, vigilância imune e o desenvolvimento sexual (WEST *et al.*, 2007).

Na glândula adrenal humana normal, a expressão de antígenos do MHC classe II está altamente correlacionada com a diferenciação celular, sendo sua expressão restrita à zona reticular (MARX *et al.*, 1996). Durante a vida fetal e nos

primeiros quatro anos de vida, as células adrenocorticais não expressam antígenos HLA classe II (MARX *et al.* 1996, 1997).

O contato celular direto entre os linfócitos e as células adrenocorticais parece estar envolvido na regulação periférica da esteroidogênese adrenal, sinalizando para uma possível associação entre a função adrenal normal e os antígenos MHC classe II (WOLKERSDÖRFER *et al.*, 1999; MARX *et al.*, 1996).

A imunorreatividade atribuída aos antígenos HLA de classe II esteve ausente em todos os tumores benignos e restrito a raras células isoladas na maioria dos tumores malignos em uma avaliação recente, sugerindo que a perda da expressão dos antígenos HLA de classe II não distingue os adenomas dos carcinomas adrenocorticais em crianças (MAGRO *et al.*, 2011).

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 MODELO DO ESTUDO

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, CAAE: 0028.0208.000-9 e CEP: 1866.033/2009-02.

Os pacientes, seus pais ou responsáveis foram informados sobre os objetivos do estudo e procedimentos a serem realizados e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram revisados 153 prontuários de pacientes tratados por TCA entre 1966 e 2011 na Unidade de Endocrinologia Pediátrica (UEP) do Hospital de Clínicas da UFPR. Durante o período de seleção, realizou-se a genotipagem de 45 pacientes em acompanhamento regular na UEP. A amostra constituiu-se de pacientes de ambos os sexos.

Familiares de primeiro e segundo graus dos pacientes também foram analisados quanto ao genótipo, totalizando 47 indivíduos (3 a 25 anos) saudáveis, portadores da mutação germinativa no gene *TP53*.

O diagnóstico histológico foi realizado pelo Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UFPR, sendo utilizados os critérios de Weiss para classificar os TCA em adenoma, carcinoma e indeterminado (neoplasia do córtex adrenal de comportamento incerto).

As coletas de sangue para a análise do *HLA* foram realizadas nos dias das consultas de rotina ou após convocação.

#### 3.2 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Após as consultas no ambulatório, os pacientes foram submetidos à punção venosa, sendo coletados 10 ml de sangue. A amostra foi armazenada em tubos estéreis do tipo BD *vacutainer*<sup>®</sup> com EDTA e encaminhadas ao LIGH.



Na sequência, realizou-se a centrifugação para obtenção da camada de leucócitos e extração do DNA pela técnica de *salting-out* (LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

### 3.3 CONCENTRAÇÃO DO DNA

A concentração de DNA das amostras foi determinada pela leitura da densidade óptica, utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop™ 2000.

Estabeleceu-se como valor padrão a concentração de 50 ng/μL para a tipagem dos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1*.

### 3.4 TIPAGEM DOS GENES HLA

A genotipagem dos genes *HLA* foi realizada inicialmente pela metodologia Dynal RELI™ SSO. As amostras em que não se obteve tipagem ou quando apresentaram ambiguidade na atribuição dos grupamentos alélicos, foram submetidas à confirmação pelo método PCR-SSO Labtype®.

As duas técnicas utilizam SSO (sondas de oligonucleotídeo específicas para a sequência alvo – gene *HLA*), sendo que o Dynal RELI™ SSO tem as sondas imobilizadas numa membrana de nylon e o método PCR-SSO Labtype® tem as sondas ligadas a microesferas codificadas por fluorescência para identificar os alelos codificados pelo DNA da amostra.

O teste Dynal RELI™ SSO baseia-se em três etapas principais: amplificação da região alvo por PCR (*Polimerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase); hibridização dos produtos amplificados (amplicon) às SSO, imobilizadas em uma membrana de nylon; e detecção do produto amplificado, ligado às sondas, por meio de reações colorimétricas.

Pela técnica SSO-RELI, o DNA alvo é amplificado pela PCR, utilizando um *primer* específico para as regiões dos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1*. A mistura de reagente de PCR, que contém a amostra de DNA, primer, Taq polimerase e outros coadjuvantes, é levada a um termociclador para que as reações de PCR ocorram.

Durante estas variações de temperatura, a dupla fita de DNA é separada, expondo a sequência alvo para que o *primer* possa fazer o anelamento e amplificação da sequência específica, fazendo várias cópias da sequência alvo. Após o processo de amplificação, os amplicons são quimicamente desnaturados, formando DNA fita simples, e são adicionados a uma membrana de nylon que contém uma série de sondas de oligonucleotídeos de sequências específicas. Os amplicons marcados com biotina hibridizam-se às sondas que contêm a sequência alvo complementar, sendo assim capturados para a fita da membrana. Após lavagens da membrana, é adicionado um composto conjugado com peroxidase de rábano de estreptavidina (SA-HRP), ligando-se aos amplicons marcados pela biotina e capturados pela sonda SSO. A adição de peróxido de hidrogênio e de substrato de tetrametilbenzidina resulta na formação de um complexo de cor azul na presença do SA-HRP. Os sinais da sonda são comparados com a intensidade da sonda do controle e utilizados para a realização da tipagem automatizada utilizando o equipamento AutoREL48.

Nas tipagens realizadas pelo método PCR-SSO Labtype<sup>®</sup> foi utilizada a PCR para obtenção da concentração necessária do DNA da região-alvo para hibridização com sondas nucleotídicas específicas para grupos alélicos dos diferentes *loci* de interesse. Estas sondas são ligadas a microesferas marcadas por fluorescência, que depois são lidas através de um citômetro de fluxo, Luminex<sup>®</sup>. O padrão das microesferas marcadas com sondas (que se ligam ou não ao DNA alvo) é interpretado e comparado com padrões de sequências conhecidas dos genes HLA determinando-se assim os alelos/grupos alélicos. A interpretação é realizada através do software LABScanTM, que fornece o resultado da tipagem do grupo alélico para cada *locus* de interesse separadamente. O programa HLA FUSION 2.0 foi utilizado para a análise dos resultados.

Os métodos de tipagem dos genes *HLA* baseiam-se principalmente na amplificação da sequência dos éxons 2 e 3 para o *HLA* de classe I, e no éxon 2 para *HLA* de classe II, que representam as regiões mais polimórficas dos genes *HLA*, possibilitando a diferenciação entre os alelos.

O método SSO fornece uma tipagem de baixa à média resolução, dependendo da especificidade das sondas utilizadas para determinados alelos.

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

#### 3.5.1 Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas foram obtidas por contagem direta através do pacote de programas ARLEQUIN versão 3.0 (SCHNEIDER *et al.*, 2000), que realiza o cálculo pela fórmula:

$$F_{al} = n/2N$$

Onde:

$F_{al}$ : frequência alélica (ou de determinado grupo alélico)

$n$ : frequência absoluta de um alelo ou grupo alélico na amostra

$N$ : número de indivíduos na amostra. O  $N$  é multiplicado por 2 pois cada indivíduo é portador de duas cópias de cada gene.

As comparações entre os grupos amostrais pacientes vs controles e familiares vs controles, das frequências alélicas, foram feitas utilizando-se tabelas de contingência L X C, do programa BioEstat – Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas (AYRES *et al.*, 2005).

As populações estudadas estavam equilíbrio

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas (indicando associação) nos casos em que  $p \leq 0,05$ . A correção de Yates foi aplicada quando necessário, de acordo com as frequências observadas dentro de cada classe utilizada no teste de contingência.

Nos casos em que a diferença entre as frequências alélicas ou gênicas de pacientes e controles apresentaram significância estatística, calculou-se o "Odds Ratio" ("OR" ou razão de probabilidades) (WOOLF, 1955), através da fórmula:

$$OR = (AXD)/(BXC)$$

Onde:

A, B, C e D são os valores correspondentes às letras do quadro 3:

|                                  | PACIENTES | CONTROLES |
|----------------------------------|-----------|-----------|
| Positivo para o fator pesquisado | A         | B         |
| Negativo para o fator pesquisado | C         | D         |

QUADRO 3 - VALORES PARA CÁLCULO DE *ODDS RATIO*  
 FONTE: Woolf (1955)

O valor da OR, em análises de associação, é considerado como sinônimo do valor de risco relativo (RR), que exprime quantas vezes a característica é mais frequente entre os portadores de um determinado fator comparando-se com indivíduos sem o fator (SVEJGAARD *et al.*, 1974).

Quando o valor de alguma das células (A, B, C ou D) foi 0, realizou-se a correção de Haldane, cuja fórmula é:  $OR = [(A+1/2) \cdot (D+1/2)] / [(B+1/2) \cdot (C+1/2)]$  (SVEJGAARD; RYDER, 1994).

## 4 RESULTADOS

Dos pacientes com TCA diagnosticados e tratados no período de 1966 a 2011, 45 participaram do estudo, sendo submetidos à tipagem dos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DRB1*. Desses, cinco negativos para a mutação germinativa R337H no gene *TP53* e um com ambiguidade genotípica, foram excluídos da análise estatística.

As características clínicas dos pacientes estão sumarizadas na tabela 1.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS 39 PACIENTES COM TUMOR DO CÓRTEX ADRENAL

| IDENTIFICAÇÃO | SEXO | IDADE AO DIAGNÓSTICO (meses) | FORMA CLÍNICA | ESTADIAMENTO | R337H <i>TP53</i> |
|---------------|------|------------------------------|---------------|--------------|-------------------|
| 1             | F    | 54                           | SM            | 4            | Sim               |
| 2             | F    | 15                           | SM            | 2            | Sim               |
| 3             | F    | 8                            | SM            | 2            | Sim               |
| 4             | F    | 24                           | SM            | 1            | Sim               |
| 5             | M    | 13                           | SC            | 2            | Sim               |
| 6             | F    | 21                           | SM            | 1            | Sim               |
| 7             | F    | 19                           | SM            | 1            | Sim               |
| 8             | F    | 10                           | SV            | 2            | Sim               |
| 9             | F    | 17                           | SV            | 1            | Sim               |
| 10            | F    | 19                           | SV            | 1            | Sim               |
| 11            | M    | 95                           | SV            | 4            | Sim               |
| 12            | M    | 102                          | SV            | 4            | Sim               |
| 13            | F    | 51                           | SV            | 2            | Sim               |
| 14            | F    | 11                           | SM            | 1            | Sim               |
| 15            | F    | 25                           | SV            | 1            | Sim               |
| 16            | M    | 36                           | SV            | 1            | Sim               |
| 17            | M    | 71                           | SV            | 1            | Sim               |
| 18            | F    | 31                           | SV            | 1            | Sim               |
| 19            | M    | 20                           | SV            | 1            | Sim               |
| 20            | M    | 161                          | SM            | 3            | Sim               |
| 21            | M    | 12                           | SM            | 1            | Sim               |
| 22            | F    | 14                           | SM            | 1            | Sim               |
| 23            | M    | 39                           | NF            | 2            | Sim               |
| 24            | F    | 30                           | SV            | 1            | Sim               |
| 25            | F    | 86                           | SV            | 1            | Sim               |
| 26            | M    | 17                           | SM            | 1            | Sim               |
| 27            | F    | 27                           | SV            | 1            | Sim               |
| 28            | F    | 42                           | SV            | 1            | Sim               |
| 29            | F    | 0                            | NF            | 1            | Sim               |
| 30            | M    | 42                           | NF            | 2            | Sim               |
| 31            | F    | 19                           | SM            | 2            | Sim               |
| 32            | M    | 15                           | SM            | 2            | Sim               |
| 33            | F    | 26                           | SV            | 4            | Sim               |
| 34            | F    | 85                           | SV            | 4            | Sim               |
| 35            | F    | 26                           | SM            | 1            | Sim               |
| 36            | M    | 45                           | SM            | 3            | Sim               |
| 37            | F    | 39                           | SV            | 1            | Sim               |
| 38            | F    | 32                           | SV            | 1            | Sim               |
| 39            | F    | 16                           | SM            | 2            | Sim               |

FONTE: O autor (2011)

NOTA: SV síndrome virilizante; SC síndrome de Cushing; SM síndrome mista; NF não funcional.

Dos 39 pacientes, 26 são do sexo feminino, com uma relação F:M de 2:1 (Gráfico 1).

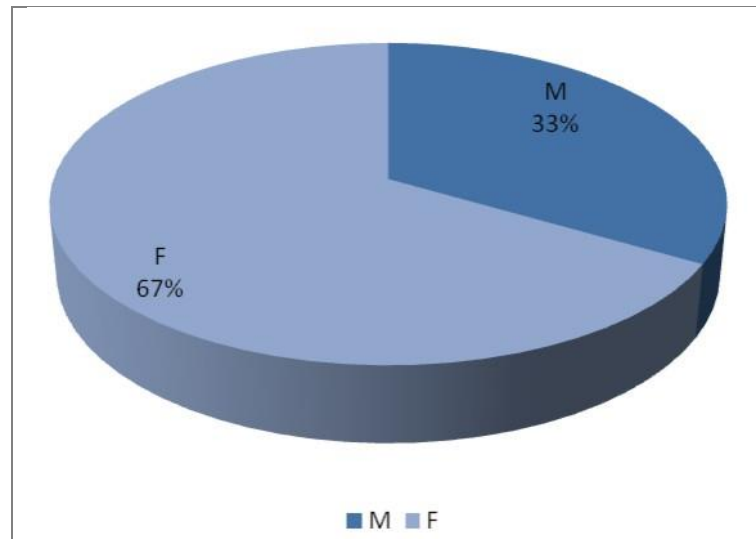


GRÁFICO 1 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM O SEXO  
FONTE: O autor (2011)

A mediana da idade ao diagnóstico foi de 2,1 anos (0-13,4 anos), sendo um caso de tumor congênito. Trinta e um (79,5%) pacientes foram diagnosticados nos primeiros quatro anos de vida (Gráfico 2).

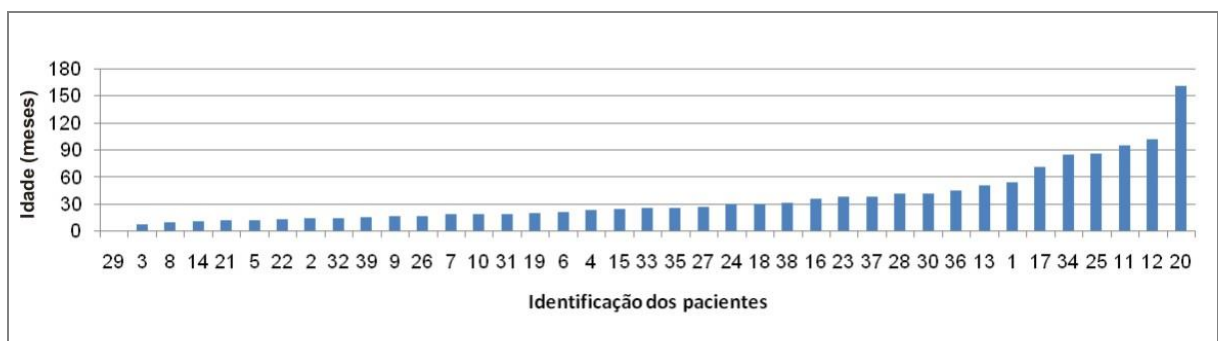


GRÁFICO 2 - IDADE DOS PACIENTES AO DIAGNÓSTICO DO TUMOR DO CÓRTEX ADRENAL  
FONTE: O autor (2011)

A mediana do intervalo entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 6 meses (0-60 meses) (Gráfico 3). A mediana do tempo de acompanhamento foi de 9,6 anos (1,7-22,3 anos).

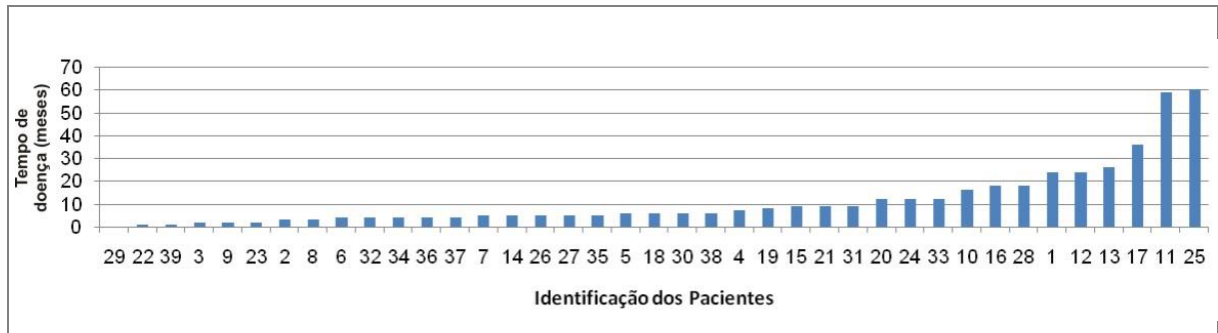


GRÁFICO 3 - TEMPO ENTRE O INÍCIO DOS SINTOMAS E O DIAGNÓSTICO DO TUMOR DO CÓRTEX ADRENAL  
 FONTE: O autor (2011)

Em relação à forma clínica, 19 (48,7%) pacientes apresentaram SV; 16 (41%) pacientes SM; 3 (7,7%) pacientes NF e um, SC (2,6%) (Gráfico 4).

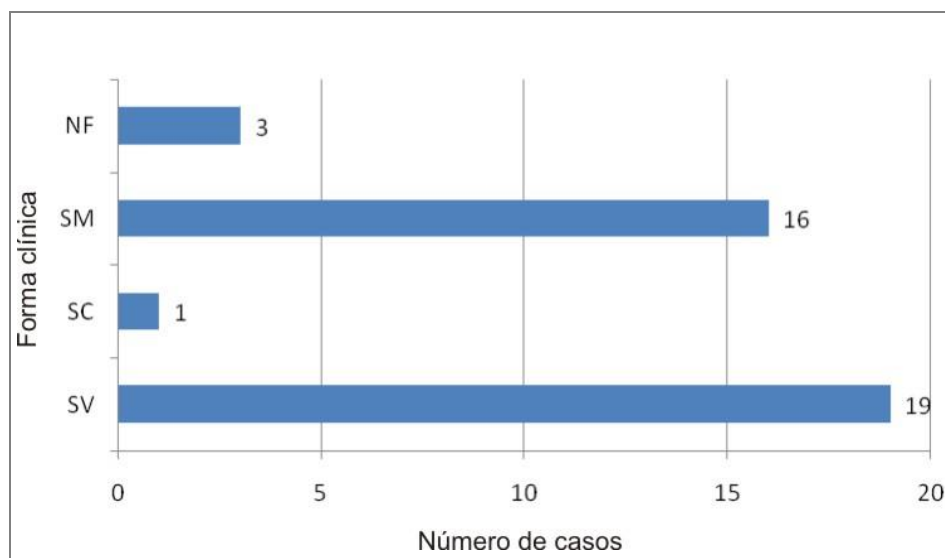


GRÁFICO 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM A FORMA CLÍNICA  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: SV – síndrome virilizante; SC – síndrome de Cushing; SM – síndrome mista e NF – tumor não funcional.

Houve predomínio dos estádios I, 22 casos (56,4%) e II, 10 casos (25,6%) em relação aos estádios III e IV, com 2 (5,1%) e 5 casos (12,8%), respectivamente (Gráfico 5).

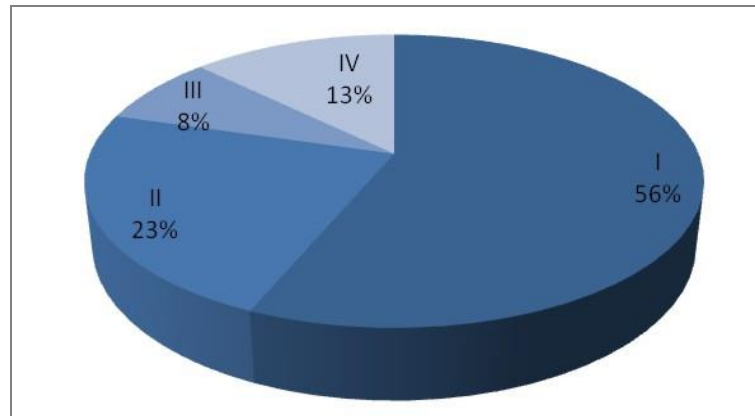


GRÁFICO 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES POR ESTADIAMENTO CLÍNICO DO TUMOR DO CÓRTEX ADRENAL  
FONTE: O autor (2011)

Em relação à histologia, 32 (82%) tumores eram carcinomas, 5 (12,8%), adenomas e 2 (5,1%) foram classificados como indeterminado para a malignidade (Gráfico 6).

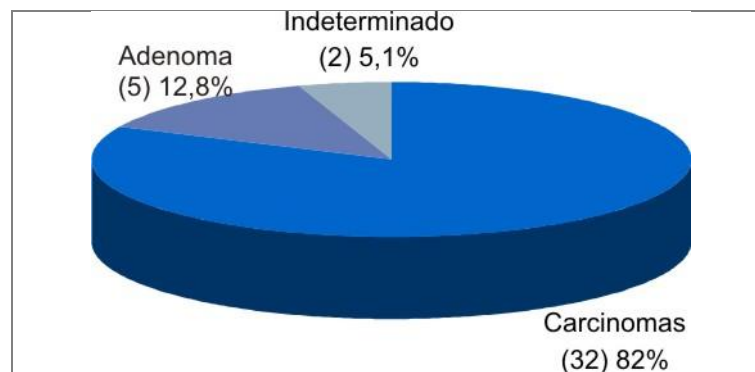


GRÁFICO 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DE ACORDO COM A HISTOLOGIA  
FONTE: O autor (2011)



#### 4.1 HLA-A

No grupo de 39 pacientes com a mutação R337H no gene *TP53*, foram identificadas 14 variantes no *HLA-A*, sendo o grupo alélico mais frequente (26,9%) o *HLA-A\*02* o e os grupos *HLA-A\*26*, *HLA-A\*32* e *HLA-A\*74* com frequências de 1,3%. (Tabela 2). As frequências alélicas dessas variantes são semelhantes às observadas na população geral.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO *HLA-A* NOS PACIENTES COM TCA, ANALISADOS POR ESTADIAMENTO E HISTOLOGIA, NOS FAMILIARES E NA POPULAÇÃO CONTROLE.

| HLA-A | PACIENTES<br>(n=39) |                     | ESTADIAMENTO   |             |                 |             | HISTOLOGIA       |             |                     |                     | FAMILIARES<br>(n=47) |             | POPULAÇÃO<br>(n=64219) |                    |
|-------|---------------------|---------------------|----------------|-------------|-----------------|-------------|------------------|-------------|---------------------|---------------------|----------------------|-------------|------------------------|--------------------|
|       |                     |                     | I-II<br>(n=32) |             | III-IV<br>(n=7) |             | Adenoma<br>(n=5) |             | Carcinoma<br>(n=32) |                     |                      |             |                        |                    |
|       | Fabs                | Frel<br>(%)         | Fabs           | Frel<br>(%) | Fabs            | Frel<br>(%) | Fabs             | Frel<br>(%) | Fabs                | Frel<br>(%)         | Fabs                 | Frel<br>(%) | Fabs                   | Frel<br>(%)        |
| Blank | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0                 | 0                    | 0,0         | 1157                   | 0,9                |
| 01    | 5                   | 6,4                 | 3              | 4,7         | 1               | 7,1         | 0                | 0,0         | 3                   | 4,7                 | 11                   | 11,7        | 12537                  | 9,8                |
| 02    | 21                  | 26,9                | 18             | 28,1        | 4               | 28,5        | 4                | 40,0        | 17                  | 26,6                | 32                   | 34,0        | 33638                  | 26,2               |
| 03    | 9                   | 11,5                | 5              | 7,8         | 4               | 28,5        | 1                | 10,0        | 8                   | 12,5                | 6                    | 6,4         | 13131                  | 10,2               |
| 11    | 3                   | 3,8                 | 3              | 4,7         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 3                   | 4,7                 | 4                    | 4,3         | 6850                   | 5,3                |
| 23    | 3                   | 3,8                 | 3              | 4,7         | 0               | 0,0         | 1                | 10,0        | 2                   | 3,1                 | 0                    | 0,0         | 5157                   | 4,0                |
| 24    | 8                   | 10,3                | 6              | 9,4         | 2               | 14,3        | 1                | 10,0        | 5                   | 7,8                 | 9                    | 9,6         | 13499                  | 10,5               |
| 25    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0                 | 0                    | 0,0         | 2173                   | 1,7                |
| 26    | 1                   | 1,3                 | 1              | 1,5         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 1                   | 1,6                 | 0                    | 0,0         | 4666                   | 3,6                |
| 29    | 2                   | 2,6                 | 2              | 3,1         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 2                   | 3,1                 | 6                    | 6,4         | 5288                   | 4,1                |
| 30    | 3                   | 3,8                 | 2              | 3,1         | 1               | 7,1         | 0                | 0,0         | 3                   | 4,7                 | 2                    | 2,1         | 5196                   | 4,0                |
| 31    | 10                  | <sup>(1)</sup> 12,8 | 7              | 10,9        | 3               | 21,4        | 2                | 20,0        | 8                   | 12,5                | 9                    | 9,6         | 6826                   | <sup>(1)</sup> 5,3 |
| 32    | 1                   | 1,3                 | 1              | 1,5         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 1                   | 1,6                 | 3                    | 3,2         | 4074                   | 3,2                |
| 33    | 2                   | 2,6                 | 1              | 1,5         | 1               | 7,1         | 1                | 10,0        | 1                   | 1,6                 | 5                    | 5,3         | 3458                   | 2,7                |
| 34    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0                 | 0                    | 0,0         | 684                    | 0,5                |
| 36    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0                 | 0                    | 0,0         | 396                    | 0,3                |
| 66    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0                 | 1                    | 1,1         | 954                    | 0,7                |
| 68    | 9                   | <sup>(1)</sup> 11,5 | 9              | 14,0        | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 9                   | <sup>(1)</sup> 14,1 | 5                    | 5,3         | 7429                   | <sup>(1)</sup> 5,8 |
| 69    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0                 | 0                    | 0,0         | 183                    | 0,1                |
| 74    | 1                   | 1,3                 | 1              | 1,5         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 1                   | 1,6                 | 1                    | 1,1         | 981                    | 0,8                |
| 80    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0                 | 0                    | 0,0         | 161                    | 0,1                |
| TOTAL | 78                  | 100,0               | 62             | 100,0       | 16              | 10,00       | 10               | 100,0       | 64                  | 100,0               | 94                   | 100,0       | 128438                 | 100,0              |

FONTE: O autor (2011)

NOTA: TCA: Tumor do córtex adrenal; n: número de indivíduos; Fabs: frequência absoluta; Frel: frequência relativa; Blank: indivíduos sem determinação do grupo alélico.

(1)  $p < 0,05$ .

Para as comparações de frequências entre os pacientes e a população controle, observaram-se os seguintes resultados com padrão de significância:

#### 4.1.1. Pacientes vs população controle

A variante *HLA-A\*31* esteve mais presente nos pacientes (12,8%) quando comparado com a população controle (5,3%), ( $p=0,02$ ;  $OR=2,62$  e  $IC95\%=1,35-5,09$ ).

#### 4.1.2 Estadio do tumor vs população controle

O grupo alélico *HLA-A\*68* mostrou-se mais frequente nos pacientes com tumor estadio I e II (14%) do que nos controles (5,8%), ( $p=0,02$ ;  $OR=2,77$  e  $IC95\%=1,36-5,61$ ).

#### 4.1.3 Histologia do tumor vs população controle

Nos pacientes com carcinoma, a variante *HLA-A\*68* é mais frequente (14,1%) do que nos controles (5,8%) ( $p=0,02$ ;  $OR=2,67$  e  $IC95\%=1,32-5,4$ ), assim como a *HLA-A\*31*, com uma frequência de 12,5% nos pacientes com carcinoma e 5,3% nos controles ( $p=0,04$ ;  $OR=2,43$  e  $IC95\%=1,16-5,09$ ).

Os dados de frequência alélica do *HLA-A* nos pacientes em relação aos controles estão resumidos na tabela 3.

TABELA 3 - COMPARAÇÃO DOS ALELOS DO *HLA-A* DOS PACIENTES, DO ESTADIO E DA HISTOLOGIA DO TUMOR EM RELAÇÃO À POPULAÇÃO CONTROLE

| HLA-A   | PACIENTES        |          | CONTROLES                 |          | p    | OR   | IC (95%)  |
|---|------------------|----------|---------------------------|----------|------|------|-----------|
|   | n <sup>(1)</sup> | Frel (%) | (n=128438) <sup>(1)</sup> | Frel (%) |      |      |           |
| Pacientes vs Controles (n=78) <sup>(1)</sup>    |                  |          |                           |          |      |      |           |
| HLA-A*31  | 10               | 12,8     | 6826                      | 5,3      | 0,02 | 2,62 | 1,35-5,09 |
| Estadio I-II vs Controles (n=64) <sup>(1)</sup> |                  |          |                           |          |      |      |           |
| HLA-A*68  | 9                | 14,0     | 7429                      | 5,8      | 0,02 | 2,77 | 1,36-5,61 |
| Carcinoma vs Controles (n=68) <sup>(1)</sup>    |                  |          |                           |          |      |      |           |
| HLA-A*31  | 8                | 12,5     | 6826                      | 5,3      | 0,04 | 2,43 | 1,16-5,09 |
| HLA-A*68  | 9                | 14,1     | 7429                      | 5,8      | 0,02 | 2,67 | 1,32-5,40 |

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Frel: frequência relativa; OR: *odds ratio*; (1) Número de alelos.

## 4.2 HLA-B

Foram identificadas 18 variantes no *HLA-B*. Os alelos mais frequentes foram o *HLA-B\*35* e *HLA-B\*39*, ambos com 12,8% e os de menor frequência o *HLA-B\*37*, *HLA-B\*38*, *HLA-B\*41*, *HLA-B\*47* e *HLA-B\*48*, 1,3% cada (tabela 3). As frequências alélicas dessas variantes são semelhantes às observadas na população geral.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉICAS DO *HLA-B* NOS PACIENTES COM TCA, ANALISADOS POR ESTADIAMENTO E HISTOLOGIA, NOS FAMILIARES E NA POPULAÇÃO CONTROLE.

| HLA-B | PACIENTES<br>(n=39) |                     | ESTADIAMENTO   |             |                 |             | HISTOLOGIA       |             |                     |             | FAMILIARES<br>(n=47) |             | POPULAÇÃO<br>(n=64219) |                    |
|-------|---------------------|---------------------|----------------|-------------|-----------------|-------------|------------------|-------------|---------------------|-------------|----------------------|-------------|------------------------|--------------------|
|       |                     |                     | I-II<br>(n=32) |             | III-IV<br>(n=7) |             | Adenoma<br>(n=5) |             | Carcinoma<br>(n=32) |             |                      |             |                        |                    |
|       | Fabs                | Frel<br>(%)         | Fabs           | Frel<br>(%) | Fabs            | Frel<br>(%) | Fabs             | Frel<br>(%) | Fabs                | Frel<br>(%) | Fabs                 | Frel<br>(%) | Fabs                   | Frel<br>(%)        |
| Blank | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 344                    | 0,3                |
| 07    | 3                   | 3,8                 | 3              | 4,7         | 0               | 0,0         | 1                | 10,0        | 2                   | 3,1         | 8                    | 8,5         | 9409                   | 7,3                |
| 08    | 3                   | 3,8                 | 2              | 3,1         | 1               | 7,1         | 0                | 0,0         | 3                   | 4,7         | 5                    | 5,3         | 7097                   | 5,5                |
| 13    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 2487                   | 1,9                |
| 14    | 9                   | <sup>(1)</sup> 11,5 | 7              | 10,9        | 2               | 14,3        | 3                | 30,0        | 5                   | 7,8         | 7                    | 7,4         | 6402                   | <sup>(1)</sup> 5,0 |
| 15    | 6                   | 7,7                 | 6              | 9,4         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 5                   | 7,8         | 13                   | 13,8        | 11425                  | 8,9                |
| 18    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 1                    | 1,1         | 6583                   | 5,1                |
| 27    | 3                   | 3,8                 | 3              | 4,7         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 3                   | 4,7         | 2                    | 2,1         | 3379                   | 2,6                |
| 35    | 10                  | 12,8                | 5              | 7,8         | 5               | 35,7        | 0                | 0,0         | 10                  | 15,6        | 10                   | 10,6        | 15257                  | 11,9               |
| 37    | 1                   | 1,3                 | 1              | 1,6         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 1                    | 1,1         | 1224                   | 1,0                |
| 38    | 1                   | 1,3                 | 1              | 1,6         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 1                   | 1,6         | 3                    | 3,2         | 3335                   | 2,6                |
| 39    | 10                  | <sup>(1)</sup> 12,8 | 7              | 10,9        | 3               | 21,4        | 2                | 20,0        | 7                   | 10,9        | 13                   | 13,8        | 4700                   | <sup>(1)</sup> 3,7 |
| 40    | 7                   | 9,0                 | 5              | 7,8         | 2               | 14,3        | 0                | 0,0         | 7                   | 10,9        | 3                    | 3,2         | 6400                   | 5,0                |
| 41    | 1                   | 1,3                 | 1              | 1,5         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 1                   | 1,6         | 1                    | 1,1         | 1597                   | 1,2                |
| 42    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 1125                   | 0,9                |
| 44    | 6                   | 7,7                 | 6              | 9,4         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 6                   | 9,4         | 8                    | 8,5         | 13701                  | 10,7               |
| 45    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 1777                   | 1,4                |
| 46    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 77                     | 0,1                |
| 47    | 1                   | 1,3                 | 0              | 0,0         | 1               | 7,1         | 0                | 0,0         | 1                   | 1,6         | 0                    | 0,0         | 332                    | 0,3                |
| 48    | 1                   | 1,3                 | 0              | 0,0         | 1               | 7,1         | 0                | 0,0         | 1                   | 1,6         | 2                    | 2,1         | 1148                   | 0,9                |
| 49    | 2                   | 2,6                 | 2              | 3,1         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 2                   | 3,1         | 4                    | 4,3         | 3254                   | 2,5                |
| 50    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 2637                   | 2,1                |
| 51    | 5                   | 6,4                 | 5              | 7,8         | 0               | 0,0         | 1                | 10,0        | 4                   | 5,9         | 7                    | 7,4         | 10802                  | 8,4                |
| 52    | 2                   | 2,6                 | 2              | 3,1         | 0               | 0,0         | 1                | 10,0        | 1                   | 1,5         | 2                    | 2,1         | 2928                   | 2,3                |
| 53    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 2108                   | 1,6                |
| 54    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 105                    | 0,1                |
| 55    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 1547                   | 1,2                |
| 56    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 631                    | 0,5                |
| 57    | 5                   | 6,4                 | 4              | 6,2         | 1               | 7,1         | 1                | 10,0        | 4                   | 6,3         | 2                    | 2,1         | 3477                   | 2,7                |
| 58    | 2                   | 2,6                 | 2              | 3,1         | 0               | 0,0         | 1                | 10,0        | 1                   | 1,6         | 1                    | 1,1         | 2480                   | 1,9                |
| 59    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 28                     | 0,0                |
| 67    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 22                     | 0,0                |
| 73    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 144                    | 0,1                |
| 78    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 70                     | 0,1                |
| 81    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 1                    | 1,1         | 373                    | 0,3                |
| 82    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0         | 0               | 0,0         | 0                | 0,0         | 0                   | 0,0         | 0                    | 0,0         | 33                     | 0,0                |
| TOTAL | 78                  | 100,0               | 62             | 100,0       | 16              | 100,0       | 10               | 100,0       | 64                  | 100,0       | 94                   | 100,0       | 128438                 | 100,0              |

FONTE: O autor (2011)

NOTA: TCA: Tumor do córtex adrenal; n: número de indivíduos; Fabs: frequência absoluta; Frel: frequência relativa; Blank: indivíduos sem determinação do grupo alélico.

(1) p < 0,05.

Para as comparações de frequências entre pacientes e controles, observaram-se os seguintes resultados com padrão de significância:

#### 4.2.1 Pacientes vs população controle

A variante *HLA-B\*14* apresentou uma frequência maior no grupo dos pacientes (11,5%), do que na população (4,98%), ( $p=0,04$ ;  $OR=2,49$  e  $IC95\%=1,24-4,98$ ), assim como o *HLA-B\*39*, com 12,8% nos pacientes contra 3,66% na população geral ( $p=0,001$ ;  $OR=3,87$  e  $IC95\%=1,99-7,52$ ).

#### 4.2.2 Estadio do tumor vs população controle

O grupamento alélico *HLA-B\*39* apresentou uma frequência maior no grupo dos pacientes com TCA estadio I-II (10,9%) do que na população controle (3,7%), ( $p=0,02$ ;  $OR=3,35$  e  $IC95\%=1,53-7,36$ ). Nos tumores com estadio III-IV o *HLA-B\*39* apresentou frequência de 21,4%, contra 3,7% na população controle ( $p=0,05$ ;  $OR=6,08$  e  $IC95\%=1,73-21,33$ ).

#### 4.2.3 Histologia do tumor vs população controle

Nos adenomas, a variante *HLA-B\*14* teve uma frequência de 30%, contra 5,0% na população controle ( $p=0,03$ ;  $OR=8,17$  e  $IC95\%=2,11-31,6$ ), enquanto nos carcinomas, o grupo alélico mais frequente foi o *HLA-B\*39* (10,9%), contra 3,7% na população controle ( $p=0,02$ ;  $OR=3,23$  e  $IC95\%=1,47-7,09$ ).

#### 4.2.4 Familiares (R337H *TP53*) vs população controle

No *HLA-B*, a variante *HLA-B\*39* foi mais frequente nos familiares (13,8%) do que na população controle (3,7%), ( $p=0,0001$ ,  $OR=4,23$  e  $IC95\%=2,35-7,59$ ).

Os dados de frequência alélica do *HLA-B* nos pacientes em relação aos controles estão resumidos na tabela 5.

TABELA 5 - COMPARAÇÃO DOS ALELOS DO *LOCUS B* DOS PACIENTES, DO ESTADIO E DA HISTOLOGIA DO TUMOR E DOS FAMILIARES (R337H *TP53*) EM RELAÇÃO À POPULAÇÃO CONTROLE

| HLA-B   | PACIENTES        |          | CONTROLES                 |          | p      | OR   | IC (95%)  |
|---|------------------|----------|---------------------------|----------|--------|------|-----------|
|   | n <sup>(1)</sup> | Frel (%) | (n=128438) <sup>(1)</sup> | Frel (%) |        |      |           |
| Pacientes vs Controles (n=78) <sup>(1)</sup>      |                  |          |                           |          |        |      |           |
| HLA-B*14  | 9                | 11,5     | 6402                      | 5,0      | 0,04   | 2,49 | 1,24-4,98 |
| HLA-B*39  | 10               | 12,8     | 4700                      | 3,7      | 0,001  | 3,87 | 1,99-7,52 |
| Estadio I-II vs Controles (n=64) <sup>(1)</sup>   |                  |          |                           |          |        |      |           |
| HLA-B*39  | 7                | 10,9     | 4700                      | 3,7      | 0,02   | 3,35 | 1,53-7,36 |
| Estadio III-IV vs Controles (n=14) <sup>(1)</sup> |                  |          |                           |          |        |      |           |
| HLA-B*39  | 3                | 21,4     | 4700                      | 3,7      | 0,05   | 6,08 | 1,73-21,3 |
| Adenoma vs Controles (n=10) <sup>(1)</sup>        |                  |          |                           |          |        |      |           |
| HLA-B*14  | 3                | 30       | 6402                      | 5,0      | 0,03   | 8,17 | 2,11-31,6 |
| Carcinoma vs Controles (n=68) <sup>(1)</sup>      |                  |          |                           |          |        |      |           |
| HLA-B*39  | 7                | 10,9     | 4700                      | 3,7      | 0,02   | 3,23 | 1,47-7,09 |
| Familiares vs Controles (n=94) <sup>(1)</sup>     |                  |          |                           |          |        |      |           |
| HLA-B*39  | 13               | 13,8     | 4700                      | 3,7      | 0,0001 | 4,23 | 2,35-7,59 |

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Frel: frequência relativa; OR: *odds ratio*; (1) Número de alelos.

#### 4.3 HLA-DRB1

Para o *HLA-DRB1* foram identificadas 13 variantes. O grupo alélico mais frequente foi o *HLA-DRB1\*13* (16,7%) e os menos frequentes o *HLA-DRB1\*09* e *HLA-DRB1\*10* (1,3%). As frequências alélicas dessas variantes são semelhantes às observadas na população geral.

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS DO *HLA-DRB1* NOS PACIENTES COM TCA, ANALISADOS POR ESTADIAMENTO E HISTOLOGIA, NOS FAMILIARES E NA POPULAÇÃO CONTROLE.

| HLA-DRB1 | PACIENTES<br>(n=39) |                     | ESTADIAMENTO   |       |                 |       | HISTOLOGIA       |       |                     |       | FAMILIARES<br>(n=47) |       | POPULAÇÃO<br>(n=64219) |                    |
|----------|---------------------|---------------------|----------------|-------|-----------------|-------|------------------|-------|---------------------|-------|----------------------|-------|------------------------|--------------------|
|          |                     |                     | I-II<br>(n=32) |       | III-IV<br>(n=7) |       | Adenoma<br>(n=5) |       | Carcinoma<br>(n=32) |       |                      |       |                        |                    |
|          | Fabs                | Frel                | Fabs           | Frel  | Fabs            | Frel  | Fabs             | Frel  | Fabs                | Frel  | Fabs                 | Frel  | Fabs                   | Frel               |
| Blank    | 0                   | 0,0                 | 0              | 0,0   | 0               | 0,0   | 0                | 0,0   | 0                   | 0,0   | 0                    | 0,0   | 556                    | 0,4                |
| 01       | 10                  | 12,8                | 10             | 15,6  | 0               | 0,0   | 2                | 20,0  | 7                   | 10,9  | 9                    | 9,6   | 13066                  | 10,2               |
| 03       | 7                   | 9,0                 | 5              | 7,8   | 2               | 14,3  | 0                | 0,0   | 6                   | 9,4   | 10                   | 10,6  | 11767                  | 9,2                |
| 04       | 7                   | 9,0                 | 4              | 6,2   | 3               | 21,4  | 2                | 20,0  | 5                   | 7,8   | 6                    | 6,4   | 16162                  | 12,6               |
| 07       | 8                   | 10,3                | 7              | 10,9  | 1               | 7,1   | 1                | 10,0  | 6                   | 9,4   | 10                   | 10,6  | 16246                  | 12,6               |
| 08       | 11                  | <sup>(1)</sup> 14,1 | 11             | 17,2  | 0               | 0,0   | 3                | 30,0  | 7                   | 10,9  | 12                   | 12,8  | 8556                   | <sup>(1)</sup> 6,7 |
| 09       | 1                   | 1,3                 | 0              | 0,0   | 1               | 7,1   | 0                | 0,0   | 1                   | 1,6   | 2                    | 2,1   | 2157                   | 1,7                |
| 10       | 1                   | 1,3                 | 1              | 1,5   | 0               | 0,0   | 0                | 0,0   | 1                   | 1,6   | 1                    | 1,1   | 2163                   | 1,7                |
| 11       | 6                   | 7,7                 | 4              | 6,2   | 2               | 14,3  | 0                | 0,0   | 6                   | 9,4   | 5                    | 5,3   | 16106                  | 12,5               |
| 12       | 3                   | 3,8                 | 3              | 4,7   | 0               | 0,0   | 0                | 0,0   | 3                   | 4,7   | 2                    | 2,1   | 2154                   | 1,7                |
| 13       | 13                  | 16,7                | 11             | 17,2  | 2               | 14,3  | 1                | 10,0  | 12                  | 18,8  | 14                   | 14,9  | 16559                  | 12,9               |
| 14       | 2                   | 2,6                 | 1              | 1,5   | 1               | 7,1   | 0                | 0,0   | 2                   | 3,1   | 8                    | 8,5   | 5490                   | 4,3                |
| 15       | 4                   | 5,1                 | 3              | 4,7   | 1               | 7,1   | 1                | 10,0  | 3                   | 4,7   | 8                    | 8,5   | 12399                  | 9,7                |
| 16       | 5                   | 6,4                 | 2              | 3,1   | 3               | 21,4  | 0                | 0,0   | 5                   | 7,8   | 7                    | 7,4   | 5057                   | 3,9                |
| TOTAL    | 78                  | 100,0               | 62             | 100,0 | 16              | 100,0 | 10               | 100,0 | 64                  | 100,0 | 94                   | 100,0 | 128438                 | 100,0              |

FONTE: O autor (2011)

NOTA: TCA: Tumor do córtex adrenal; n: número de indivíduos; Fabs: frequência absoluta; Frel: frequência relativa; Blank: indivíduos sem determinação do grupo alélico.

(1)  $p < 0,05$

Para as comparações de frequências entre os pacientes e controles, observaram-se os seguintes resultados com padrão de significância:

#### 4.3.1 Pacientes vs população controle

O alelo *HLA-DRB1\*08* apresentou frequência maior nos pacientes (14,1%) do que na população (6,7%), ( $p=0,03$ ; OR=2,30 e IC95%=1,22-4,35).

#### 4.3.2 Estadio do tumor vs população controle

A variante *HLA-DRB1\*08* nos pacientes com tumor estadio I-II foi mais frequente (17,2%) do que na população controle (6,7%), ( $p=0,006$ ; OR=3,02 e IC95%=1,57-5,80).

#### 4.3.3 Histologia do tumor vs população controle

Nos adenomas, o alelo *HLA-DRB1\*08* teve uma frequência de 30%, contra 6,7% na população controle ( $p=0,07$ ;  $OR=6,00$  e  $IC95\%=1,55-23,23$ ). Em relação aos carcinomas, não foi encontrado nenhum alelo predominante em relação à população.

#### 4.3.4 Familiares (R337H *TP53*) vs população controle

No *locus* DRB1, o grupamento alélico *HLA-DRB1\*08* teve frequência maior nos familiares portadores da mutação R337H no gene *TP53* (12,8%) do que na população controle (6,7%), ( $p=0,05$ ,  $OR=2,05$  e  $IC95\%=1,12-3,76$ ).

Os dados de frequência alélica do *HLA-DRB1* nos pacientes e familiares portadores da mutação em relação aos controles estão resumidos na tabela 7.

TABELA 7 - COMPARAÇÃO DOS ALELOS DO *LOCUS* DR DOS PACIENTES, DO ESTADIO E DA HISTOLOGIA DO TUMOR E DOS FAMILIARES (R337H *TP53*) EM RELAÇÃO À POPULAÇÃO CONTROLE

| HLA-DRB1  | PACIENTES        |          | CONTROLES                 |          | p     | OR   | IC (95%)   |
|---|------------------|----------|---------------------------|----------|-------|------|------------|
|   | n <sup>(1)</sup> | Frel (%) | (n=128438) <sup>(1)</sup> | Frel (%) |       |      |            |
| Pacientes vs Controles (n=78) <sup>(1)</sup>    |                  |          |                           |          |       |      |            |
| HLA-DR*08                                       | 11               | 14,1     | 8556                      | 6,7      | 0,03  | 2,3  | 1,22-4,35  |
| Estadio I-II vs Controles (n=64) <sup>(1)</sup> |                  |          |                           |          |       |      |            |
| HLA-DR*08                                       | 11               | 17,7     | 8556                      | 6,7      | 0,006 | 3,02 | 1,57-5,80  |
| Adenoma vs Controles (n=10) <sup>(1)</sup>      |                  |          |                           |          |       |      |            |
| HLA-DR*08                                       | 3                | 30       | 8556                      | 6,7      | 0,07  | 6    | 1,55-23,23 |
| Familiares vs Controles (n=94) <sup>(1)</sup>   |                  |          |                           |          |       |      |            |
| HLA-DR*08                                       | 12               | 12,8     | 8556                      | 6,7      | 0,05  | 2,05 | 1,12-3,76  |

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Frel: frequência relativa; OR: *odds ratio*; (1) Número de alelos.



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 A MUTAÇÃO NO GENE *TP53* E O TCA

Os fatores envolvidos na incidência aumentada do TCA na infância nas regiões sul e sudeste do Brasil, amplamente referida nas últimas décadas (MARIGO; MUELLER; DAVIES, 1969; RIBEIRO *et al.*, 1990; SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997; WAJCHENBERG *et al.*, 2000; MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004), continua sendo motivo de pesquisa. Inicialmente, levantou-se a hipótese de fatores ambientais, como pesticidas agrícolas, em virtude de as regiões sul e sudeste terem uma atividade agrícola bastante grande e uso intensivo dos mesmos (SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997).

A mutação germinativa R337H no gene supressor tumoral *TP53*, presente em 95% das crianças com TCA no estado do Paraná (RIBEIRO *et al.*, 2001), e em 77,7% das crianças no estado de São Paulo (LATRONICO *et al.*, 2001), tem sido considerada um co-fator importante no processo de tumorigênese adrenocortical. Figueiredo *et al.* (2006), estudaram 40 crianças (de 30 famílias) com TCA e a mutação R337H no *TP53*. Investigaram a presença da mutação nos genitores e parentes de primeiro e segundo grau e encontraram uma penetrância de 9,9% para TCA nos indivíduos portadores da mutação, sugerindo que 1 em cada 10 indivíduos com a mutação desenvolveria o TCA até a idade de 10 anos. Dados de Marques-Pereira, acompanhando 57 crianças (0-15 anos), portadoras da mutação R337H no gene *TP53*, parentes de primeiro e segundo grau de crianças com TCA e a mesma mutação, por 3,9 anos, com exame clínico, laboratorial e de imagem (US adrenal de alta resolução), não mostraram nenhum caso de TCA (MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2006). A maior parte dessas crianças continua em acompanhamento até esta data, e nenhum caso de TCA foi diagnosticado (dados não publicados). Esses achados são incompatíveis com a penetrância de 9,9% referida por Figueiredo *et al.*

Mutações germinativas do gene *TP53* têm sido descritas em associação com a Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), caracterizada pela susceptibilidade para carcinoma de mama, sarcoma de tecidos moles, osteossarcoma, leucemia e tumor do córtex adrenal nos indivíduos afetados (LI; FRAUMENI, 1969). Achatz *et al.* (2007) relatam

uma associação entre a mutação R337H no *TP53* e a SLF e a SLF *like* em estudo de 45 indivíduos com tumores de mama, sistema nervoso central, tecidos moles e TCA, de famílias com critérios clínicos de SLF e SLF *like*. Contudo, Ribeiro *et al.* (2007), sugerem que uma investigação epidemiológica extensiva é necessária para determinar se a mutação em foco confere maior susceptibilidade para outros tumores além do TCA.

Dos 45 pacientes incluídos neste estudo, 40 (89%) são portadores da mutação R337H no *TP53*.

## 5.2 HLA

Os genes *HLA* de Classe I (*HLA-A*, *HLA-B*) codificam proteínas que estão presentes em todas as células nucleadas e que são essenciais para apresentação de peptídeos estranhos para os linfócitos citotóxicos T CD8+ (células do sistema imune capazes de reconhecer e eliminar as células com transformação neoplásica ou aquelas infectadas por vírus). Os genes *HLA* de Classe II (*HLA-DR*, *HLA-DQ* e *HLA-DP*) expressam-se em células do sistema imune que apresentam antígenos estranhos para linfócitos T CD4+, cuja função é modular a resposta de anticorpos e a resposta de linfócitos T CD8+ (ABBAS; LICHTMAN, 2008).

A apresentação de peptídeos derivados de proteínas próprias, transformadas durante o processo neoplásico, por proteínas HLA de Classe I, é fundamental para iniciar reações imunes visando à eliminação do tumor. Indivíduos com determinadas variantes alélicas podem ter uma menor eficiência na apresentação de peptídeos oncogênicos e consequente ativação de linfócitos T CD8+, favorecendo o escape das células neoplásicas da imunovigilância (ABBAS; LICHTMAN, 2008).

A relação entre o *HLA* e diversas doenças tem sido estudada há mais de quatro décadas (CAILLAT-ZUCMAN, 2008). Um dos principais exemplos de associação é a presença do *HLA-B\*27* em mais de 90% dos indivíduos com espondilite anquilosante, apesar de que o mecanismo da doença envolve a presença de outros genes (COLBERT; DELAY; KLENK, 2010). Em relação às neoplasias, há extensa experiência da associação do HLA com as leucemias, com osteossarcoma e com linfoma de Hodgkin (KLITZ *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 2007; BARION *et al.*, 2007).

### 5.2.1 HLA-A

Não há relatos na literatura de estudos mostrando associação entre o *HLA-A* e TCA. Neste estudo, encontrou-se uma frequência maior dos grupos alélicos *HLA-A\*31* (pacientes vs controles; carcinomas vs controles) e *HLA-A\*68* (tumores estadio I-II vs controles; carcinomas vs controles) nos pacientes em relação à população controle.

### 5.2.2 HLA-B

Assim como em relação ao *HLA-A*, não existem publicações associando o *HLA-B* e TCA. Neste estudo, observou-se uma maior frequência no grupo pacientes, do *HLA-B\*14* e do *HLA-B\*39*, quando comparado aos controles.

Em relação ao estadio dos tumores, encontrou-se uma frequência significativamente maior do grupo alélico *HLA-B\*39* no grupo pacientes do que no grupo controles, independentemente do estadio.

Quanto à histologia do tumor, o grupo alélico *HLA-B\*14*, nos adenomas e o *HLA-B\*39* nos carcinomas, foram mais frequentes do que na população. O achado em relação aos adenomas deve ser interpretado com cautela, uma vez que o número de pacientes com adenoma é pequeno. Dessa forma, a pesquisa da prevalência do grupo alélico *HLA-B\*14* nos pacientes com adenoma deve ser avaliada em um número maior de pacientes.

Os familiares portadores da mutação germinativa R337H no gene *TP53* também apresentaram o grupo alélico *HLA-B\*39* com uma frequência maior do que a encontrada na população, demonstrando que apenas a presença dessa variante não é suficiente para o desenvolvimento do TCA.

### 5.2.3 HLA-DRB1

Existem poucas pesquisas dirigidas ao estudo do *HLA* classe II na tumorigênese adrenal. Já foi demonstrada uma redução da expressão dos antígenos *HLA-DRB1* nos tumores, principalmente nos carcinomas (MARX *et al.*, 1996; MAGRO *et al.*, 2011).

Wolkersdörfer *et al.* (2005), identificaram a prevalência do grupo alélico *HLA-DRB1\*01* em 6 de 11 (54,5%) casos de carcinoma. Em nossa casuística, a variante *HLA-DRB1\*01* está presente em 10,9% dos carcinomas.

Neste estudo, verificou-se que o grupamento alélico *HLA-DRB1\*08* é mais frequente nos pacientes do que nos controles e, inclusive, nos pacientes com tumores estadios I-II, mas não III-IV. Possivelmente, este achado poderia servir como mais um elemento para tipificar os TCA quanto ao estadiamento e prognóstico. Entretanto, estas observações devem ser confirmadas avaliando-se um número maior de pacientes de todos os estadios. Outros trabalhos devem ser conduzidos a fim de se verificar se a redução da expressão dos antígenos DRB1 nos tumores está associada ao grupo alélico *HLA-DRB1\*08*.

## 6 CONCLUSÕES

Tomados em conjunto, os dados do presente estudo sugerem associação entre o sistema *HLA* e o tumor de córtex adrenal na infância, sendo que o *HLA-A\*31*, *HLA-A\*68*, *HLA-B\*14*, *HLA-B\*39* e *HLA-DR\*08* foram considerados como grupos alélicos predisponentes e associados a diferentes estadios e à histologia do TCA.

Estudos de segregação de haplótipos e análise de alta resolução dos grupamentos alélicos estão indicados para melhor compreensão dos mecanismos da associação entre *HLA* e TCA.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. O complexo principal de histocompatibilidade. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.97-111.

ABIVEN, G.; COSTE, J.; GROUSSIN, L.; ANRACT, P.; TISSIER, F.; LEGMANN, P.; DOUSSET, B.; BERTAGNA, X.; BERTHERAT, J. Clinical and Biological Features in the Prognosis of Adrenocortical Cancer: Poor Outcome of Cortisol-Secreting Tumors in a Series of 202 Consecutive Patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91, n.7, p.2650-2655, 2006.

ABRAMS, H. L.; SIEGELMAN, S. S.; ADAMS, D. F.; SANDERS, R.; FINBERG, H. J.; HESSEL, S. J.; McNEIL, B. J. Computed tomography versus ultrasound of the adrenal gland: a prospective study. **Radiology**, v.143, n.1, p.121-128, 1982.

ACHATZ, M. I.; OLIVIER, M.; LE CALVEZ, F.; MARTEL-PLANCHE, G.; LOPES, A.; ROSSI, B. M.; ASHTON-PROLLA, P.; GIUGLIANI, R.; PALMERO, E. I.; VARGAS, F. R.; DA ROCHA, J. C.; VETTORE, A. L.; HAINAUT, P. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett**, v.245, n.1-2, p.96-102, 2007.

ALMEIDA, M. Q.; FRAGOSO, M. C. B. V.; LOTFI, C. F. P.; SANTOS, M. G.; NISHI, M. Y.; COSTA, M. H. S.; LERARIO, A. M.; MACIEL, C. C.; MATTOS, G. E.; JORGE, A. A. L.; MENDONCA, B. B.; LATRONICO, A. C. Expression of Insulin-Like Growth Factor-II and Its Receptor in Pediatric and Adult Adrenocortical Tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v.93, n.9, p.3524-3531, 2008.

ALMEIDA, M. Q.; SOARES, I. C.; RIBEIRO, T. C.; FRAGOSO, M. C. B. V.; MARINS, L. V.; WAKAMATSU, A.; RESSIO, R. A.; NISHI, M. Y.; JORGE, A. A. L.; LERARIO, A. M.; ALVES, V. A. F.; MENDONCA, B. B.; LATRONICO, A. C. Steroidogenic Factor 1 overexpression and Gene Amplification Are More Frequent in Adrenocortical Tumors from Children than from Adults **J Clin Endocrinol Metab**, v.95, n.3, p.1458-1462, 2010.

AYRES, M.; AYRES, M. J. R.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **Bioestat**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências da saúde. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, Ministério da Ciência e Tecnologia, Imprensa Oficial do Estado do Pará, 2005.

BARION, L. A.; TSUNETO, L. T.; TESTA, G. V.; LIEBER, S. R.; PERSOLI, L. B. L.; BARBOSA, S.; MARQUES, D.; VIGORITO, A. C.; ARANHA, F. J. P.; EID, K. A. B.; OLIVEIRA, G. B.; MIRANDA, E. C. M.; SOUZA, C. A.; VISENTAINER, J. E. L. Associação entre HLA e leucemia em uma população brasileira de etnia mista. **Rev Assoc Med Bras**, v.53, n.3, p.252-256, 2007.

BELL, J. Chromosome crawling in the MHC. **Trends Genet**, v.5, n.9, p.289-290, 1989.

BERNSTEIN, L.; GURNEY, J. Chapter XI Carcinomas and Other Malignant Epithelial Neoplasms. In: RIES, L. A. G.; SMITH, M. A.; GURNEY, J. G.; LINET, M.; TAMRA, T.; YOUNG, J. L.; BUNIN, G. R. (Eds.). **Cancer Incidence and Survival Among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995**. Bethesda Md: Cancer Statistics Branch, Cancer Surveillance Research Program, Division of Cancer Control and Population Sciences, National Cancer Institute, 1999. p.139-147.

BEUSCHLEIN, F.; REINCKE, M.; KARL, M.; TRAVIS, W. D.; JAURSCH-HANCKE, C.; ABDELHAMID, S.; CHROUSOS, G. P.; ALLOLIO, B. Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. **Cancer Res**, v.54, n.18, p.4927-4932, 1994.

BLAKE, M. A.; CRONIN, C. G.; BOLAND, G. W. Adrenal Imaging. **Am J Roentgenol**, v.194, n.6, p.1450-1460, 2010.

BLAKER, H.; SUTTER, C.; KADMON, M.; OTTO, H. F.; VON KNEBEL-DOEBERITZ, M.; GEBERT, J.; HELMKE, B. M. Analysis of somatic APC mutations in rare extracolonic tumors of patients with familial adenomatous polyposis coli. **Genes Chromosomes Cancer**, v.41, n.2, p.93-98, 2004.

BUGG, M. F.; RIBEIRO, R. C.; ROBERSON, P. K.; LLOYD, R. V.; SANDRINI, R.; SILVA, J. B.; EPELMAN, S.; SHAPIRO, D. N.; PARHAM, D. M. Correlation of pathologic features with clinical outcome in pediatric adrenocortical neoplasia. A study of a Brazilian population. Brazilian Group for Treatment of Childhood Adrenocortical Tumors. **Am J Clin Pathol**, v.101, n.5, p.625-629, 1994.

CAILLAT-ZUCMAN, S. Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. **Tissue Antigens**, v.73, n.1, p.1-8, 2008.

CIFTCI, A. O.; SENOCAK, M. E.; TANYEL, F. C.; BÜYÜKPAMUKÇU, N. Adrenocortical tumors in children. **J Pediatr Surg**, v.36, n.4, p.549-554, 2001.

COLBERT, R. A.; DELAY, M. L.; KLENK, E. I. From HLA-B27 to spondyloarthritis: a journey through the ER. **Immunol Rev**, v.233, n.1, p.181-202, 2010.

DAFFARA, F.; DE FRANCIA, S.; REIMONDO, G.; ZAGGIA, B.; AROASIO, E.; PORPIGLIA, F.; VOLANTE, M.; TERMINE, A.; DI CARLO, F.; DOGLIOTTI, L.; ANGELI, A.; BERRUTI, A.; TERZOLO, M. Prospective evaluation of mitotane toxicity in adrenocortical cancer patients treated adjuvantly. **Endocr Relat Cancer**, v.15, p.1043-1053, 2008.

DECHIARA, T. M.; ROBERTSON, E. J.; EFSTRATIADIS, A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. **Cell**, v.64, n.4, p.849-859, 1991.

DIÁZ-CANO SJ, MIGUEL M, BLANES A, TASHJIAN R, GALERA H, WOLFE, H. Clonality as Expression of Distinctive Cell Kinetics Patterns in Nodular Hyperplasias and Adenomas of the Adrenal Cortex. **Am J Pathol**, v.156, n.1, p.311-319, 2000.

DIGIAMMARINO, E. L.; LEE, A. S.; CADWELL, C.; ZHANG, W.; BOTHNER, B.; RIBEIRO, R. C.; ZAMBETTI, G.; KRIWACKI, R. W. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol**, v.9, n.1, p.12-16, 2002.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol Ecol Resour**, v.10, n.3, p.564-567, 2010.

FIGUEIREDO, B. C.; CAVALLI, L. R.; PIANOVSKI, M. A.; LALLI, E.; SANDRINI, R.; RIBEIRO, R. C.; ZAMBETTI, G.; DELACERDA, L.; RODRIGUES, G. A.; HADDAD, B. R. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v.90, n.2, p.615-619, 2005.

FIGUEIREDO, B. C.; SANDRINI, R.; ZAMBETTI, G. P.; PEREIRA, R. M.; CHENG, C.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; MASTELLARO, M. J.; VIANNA, S.; WATANABE, F.; SANDRINI, F.; ARRAM, S. B.; BOFFETTA, P.; RIBEIRO, R. C. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. **J Med Genet**, v.43, n.1, p.91-96, 2006.

FIGUEIREDO, B. C.; STRATAKIS, C. A.; SANDRINI, R.; DELACERDA, L.; PIANOVSKY, M. A.; GIATZAKIS, C.; YOUNG, H. M.; HADDAD, B. R. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **J Clin Endocrinol Metab**, v.84, n.3, p.1116-1121, 1999.

GHODKE, Y.; JOSHI, K.; CHOPRA, A.; PATWARDHAN, B. HLA and disease. **Eur J Epidemiol**, v.20, n.6, p.475-488, 2005.



GICQUEL, C.; BERTAGNA, X.; GASTON, V.; COSTE, J.; LOUVEL, A.; BAUDIN, E.; BERTHERAT, J.; CHAPUIS, Y.; DUCLOS, J. M.; SCHLUMBERGER, M. PLOUIN, P. F.; LUTON, J. P.; LE BOUC, Y. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. **Cancer Res**, v.61, n.18, p.6762-6767, 2001.

GIORDANO, T. J.; THOMAS, D. G.; KUICK, R.; LIZYNESS, M.; MISEK, D. E.; SMITH, A. L.; SANDERS, D.; ALJUNDI, R. T.; GAUGER, P. G.; THOMPSON, N. W.; TAYLOR, J. M.; HANASH, S. M. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. **Am J Pathol**, v.162, n.2, p.521-531, 2003.

GREENSPAN, F. S.; STREWLER, G. J. **Endocrinologia básica e clínica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

GUO, S.; THOMPSON, E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, n.2, p.361-372, 1992.

HISADA, M.; GARBER, J. E.; FUNG, C. Y.; FRAUMENI, J. F.; LI, F. P. Multiple primary cancers in families with li-fraumeni syndrome. **J Natl Cancer Inst**, v.90, n.8, p.606-611, 1998.

JAIN, M.; KAPOOR, S.; MISHRA, A.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Weiss criteria in large adrenocortical tumors: a validation study. **Indian J Pathol Microbiol**, v.53, n.2, p.222-226, 2010.

KIKUCHI, A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. **Cancer Sci**, v.94, n.3, p.225-229, 2003.

KLITZ, W.; ALDRICH, C. L.; FILDES, N.; HORNING, S. J.; BEGOVICH, A. B. Localization of Predisposition to Hodgkin Disease in the HLA Class II Region. **Am J Hum Genet**, v.54, n.3, p.497-505, 1994.

LAHIRI, D. K.; NURNBERGER, J. R. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HWM DNA from blood for RFPL studies. **Nucleic Acids Res**, v.19, n.19, p.5444, 1991.

LAMM, L. U.; OLAISEN, B. Report of the committee on the genetic constitution of the chromosome 5 and 6. **Cytogenet Cell Genet**, v.40, n.1-4, p.128-155, 1985.

LATRONICO, A. C.; CHROUSOS, G. P. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, n.5, p.1317-1324, 1997.

LATRONICO, A. C.; PINTO, E. M.; DOMENICE, S.; FRAGOSO, M. C.; MARTIN, R. M.; ZERBINI, M. C.; LUCON, A. M.; MENDONCA, B. B. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, n.10, p.4970-4973, 2001.

LEAL, L. F.; MERMEJO, L. M.; RAMALHO, L. Z.; MARTINELLI, C. E.; YUNES, J. A.; SEIDINGER, A. L.; MASTELLARO, M. J.; CARDINALI, I. A.; BRANDALISE, S. R.; MOREIRA, A. C.; TONE, L. G.; SCRIDELI, C. A.; CASTRO, M.; ANTONINI, S. R. Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Deregulation in Childhood Adrenocortical Tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v.96, n.10, p.3106-3114, 2011.

LEE, M. J.; HAHN, P. F.; PAPANICOLAOU, N.; EGGLIN, T. K.; SAINI, S.; MUELLER, P. R.; SIMEONE, J. F. Benign and malignant adrenal masses: CT distinction with attenuation coefficients, size and observer analysis. **Radiology**, v.179, n.2, p.415-418, 1991.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v.88, n.3, p.323-331, 1997.

LI, F. P.; FRAUMENI JR., J. F. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome, **J Natl Cancer Inst**, v.43, n.6, p.1365-1373, 1969.

LIBÈ, R.; BERTHERAT, J. Molecular genetics of adrenocortical tumors, from familial to sporadic diseases. **Eur J Endocrinol**, v.153, n.4, p.477-487, 2005.

LIBÈ, R.; FRATTICCI, A.; BERTHERAT, J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. **Endocr Relat Cancer**, v.14, n.1, p.13-28, 2007.

LOGIÉ, A.; BOULLE, N.; GASTON, V.; PERIN, L.; BOUDOU, P.; LE BOUC, Y.; GICQUEL, C. Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line. **J Mol Endocrinol**, v.23, n.1, p.23-32, 1999.

MAGRO, G.; ESPOSITO, G.; CECCHETTO, G.; DALL'IGNA, P.; MARCATO, R.; GAMBINI, C.; BOLDRINI, R.; COLLINI, P.; D'ONOFRIO, V.; SALFI, N.; D'AMORE, E.; FERRARI, A.; BISOGNO, G.; ALAGGIO, R. Pediatric adrenocortical tumors: morphological diagnostic criteria and immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase type 2 and human leucocyte-associated antigen (HLA) class II antigens. Results from the Italian Pediatric Rare Tumor (TREP) Study project. **Human Pathol**, 2011. Article in press.

MARIGO, C.; MUELLER, H.; DAVIES, J. Survey of cancer in children admitted to a Brazilian charity hospital. **J Natl Cancer Inst**, v.43, n.6, p.1231-1240, 1969.

MARQUES-PEREIRA, R.; MICHALKIEWICZ E, SANDRINI F, FIGUEIREDO BC, PIANOVSKI M, FRANCA SN, BOGUSZEWSKI MC, COSTA O, CAT I, LACERDA FILHO L AND SANDRINI R. Childhood adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.48, n.5, p.651-658, 2004.

MARQUES-PEREIRA, R.; MICHALKIEWICZ, E.; PIANOVSKI, M. A.; FRANCA, S. N.; BOGUSZEWSKI, M. C.; CAT, I.; LACERDA FILHO, L.; SANDRINI, R. Tratamento do Tumor do Córtex Adrenal na Infância. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.49, n.5, p.747-752, 2005.

MARQUES-PEREIRA, R.; DELACERDA, L.; LACERDA, H.; MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, F.; SANDRINI, R. Childhood Adrenocortical Tumours: a Review. **Hered Cancer in Clin Pract**, v.4, n.2, p.81-89, 2006.

MARX, C.; BORNSTEIN, S. R.; WOLKERSDÖRFER, G. W. Cellular immune-endocrine interactions in adrenocortical tissues. **Eur J Clin Invest**, v.30, Suppl. 3, p.1-5, 2000.

MARX, C.; BORNSTEIN, S. R.; WOLKERSDÖRFER, G. W.; PETER, M.; SIPPELL, W. G.; SCHERBAUM, W. A. Relevance of Major Histocompatibility Complex Class II Expression as a Hallmark for the Cellular Differentiation in the Human Adrenal Cortex. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, n.9, p.3136-3140, 1997.

MARX, C.; WOLKERSDÖRFER, G. W.; BROWN, J. W.; SCHERBAUM, W. A.; BORNSTEIN, S. R. MHC class II expression – a new tool to assess dignity in adrenocortical tumours. **J Clin Endocrinol Metab**, v.81, n.12, p.4488-4491, 1996.

MESIANO, S.; MELLON, S. H.; GOSPODAROWICZ, D.; DI BLASIO, A. M.; JAFFE, R. B. Basic fibroblast growth factor expression is regulated by corticotropin in the human fetal adrenal: a model for adrenal growth regulation. **PNAS**, v.88, n.12, p.5428-5432, 1991.

MESIANO, S.; MELLON, S. H.; JAFFE, R. B. Mitogenic action, regulation, and localization of insulin-like growth factors in the human fetal adrenal gland. **J Clin Endocrinol Metab**, v.76, n.4, p.968-976, 1993.

MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, R.; FIGUEIREDO, B.; MIRANDA, E. C.; CARAN, E.; OLIVEIRA-FILHO, A. G.; MARQUES, R.; PIANOVSKI, M. A.; LACERDA, L.; CRISTOFANI, L. M.; JENKINS, J.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; RIBEIRO, R. C. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **J Clin Oncol**, v.22, n.5, p.838-845, 2004.

OLIVEIRA, I. D.; PETRILLI, A. S.; TAVELA, M. H.; ZAGO, M. A.; DE TOLEDO, S. R. C. TNF-alpha, TNF-beta, IL-6, IL-10, PECAM-1 and the MPO Inflammatory Gene Polymorphisms in Osteosarcoma. **J Pediatr Hematol Oncol**, v.29, n.5, p.293-297, 2007.

PARKER, K. L.; SCHIMMER, B. P. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. **Endocr Rev**, v.18, n.3, p.361-377, 1997.

PIANOVSKI, M. A.; MALUF, E. M.; DE CARVALHO, D. S.; RIBEIRO, R. C.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; BOFFETTA, P.; ZANCANELLA, P.; FIGUEIREDO, B. C. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. **Pediatr Blood Cancer**, v.47, n.1, p.56-60, 2006.

PINTO, E. M.; BILLERBECK, A. E.; VILLARES, M. C.; DOMENICE, S.; MENDONCA, B. B.; LATRONICO, A. C. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.48, n.5, p.647-650, 2004.

PINTO, E. M.; RIBEIRO, R. C.; KLETTER, G. B.; LAWRENCE, J. P.; JENKINS, J.; WANG, J.; SHURTLEFF, S.; MCGREGOR, L.; KRIWACKI, R.; ZAMBETTI, G. P. Inherited germline TP53 mutation encodes a protein with an aberrant C-terminal motif in a case of pediatric adrenocortical tumor. **Fam Cancer**, v.10, n.1, p.141-146, 2011.

PRAGER, G.; HEINZ-PEER, G.; PASSLER, C.; KACZIREK, K.; SCHEUBA, C.; NIEDERLE, B. Applicability of laparoscopic adrenalectomy in a prospective study in 150 consecutive patients. **Arch Surg**, v.139, n.1, p.46-49, 2004.

RIBEIRO, R. C.; GALINDO, C. R.; FIGUEIREDO, B. C. Germline TP53 R337H mutation is not sufficient to establish Li-Fraumeni or Li-Fraumeni-like syndrome. **Cancer Letters**, v.247, n.2, p.353-355, 2007.

RIBEIRO, R. C.; MICHALKIEWICZ, E.; FIGUEIREDO, B. C.; DELACERDA, L.; SANDRINI, F.; PIANOVSKI, M. D.; SAMPAIO, G.; SANDRINI, R. Adrenocortical tumors in children. **Bras J Med Biol Res**, v.33, n.10, p.1225-1234, 2000.

RIBEIRO, R. C.; SANDRINI NETO, R. S.; SHELL, M. J.; LACERDA, I.; SAMBAIO, G. A.; CAT, I. Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. **J Clin Oncol**, v.8, n.1, p.67-74, 1990.

RIBEIRO, R. C.; SANDRINI, F.; FIGUEIREDO, B.; ZAMBETTI, G. P.; MICHALKIEWICZ, E.; LAFFERTY, A. R.; DELACERDA, L.; RABIN, M.; CADWELL, C.; SAMPAIO, G.; CAT, I.; STRATAKIS, C. A.; SANDRINI, R. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.16, p.9330-9335, 2001.

ROSATI, R.; CERRATO, F.; DOGHMAN, M.; PIANOVSKI, M. A. D.; PARISE, G. A.; CUSTÓDIO, G.; ZAMBETTI, G. P.; RIBEIRO, R. C.; RICCIO, A.; FIGUEIREDO, B. C.; LALLI, E. High frequency of loss of heterozygosity at 11p15 and *IGF2* overexpression is not associated with clinical outcome in childhood adrenocortical tumors positive for the R337H *TP53* mutation. **Cancer Genet Cytogenet**, v.186, n.1, p.19-24, 2008.

SANDRINI, R.; RIBEIRO, R. C.; DELACERDA, L. Childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, n.7, p.2027-2031, 1997.

SBRAGIA, L.; OLIVEIRA-FILHO, A. G.; VASSALLO, J.; PINTO, G. A.; GUERRA-JÚNIOR, G.; BUSTORFF-SILVA, J. Adrenocortical tumors in Brazilian children: immunohistochemical markers and prognostic factors. **Arch Pathol Lab Med**, v.129, n.9, p.1127-1131, 2005.

SCHLUND, J. F.; KENNEY, P. J.; BROWN, E. D.; ASCHER, S. M.; BROWN, J. J.; SEMELKA, R. C. Adrenocortical carcinoma: MR imaging appearance with current techniques. **J Magn Reson Imaging**, v.5, p.171-174, 1995.

SCHNEIDER, S.; KUEFER, J.M.; ROESLLI, D.; EXCOFIER, L. **ARLEQUIN**: a software for population genetics analysis, version 1.1. Genetics and Biometry laboratories, Dept. of Anthropology, University of Geneva, 2000.

SEMELKA, R. C.; SHOENUT, J. P.; LAWRENCE, P. H.; GREENBERG, H. M.; MAYCHER, B.; MADDEN, T. P.; KROEKER, M. A. Evaluation of adrenal masses with gadolinium enhancement and fat-suppressed MR imaging. **J Magn Reson Imaging**, v.3, n.2, p.337-343, 1993.

SKARSGARD, E. D.; ALBANESE, C. T. The Safety and Efficacy of Laparoscopic Adrenalectomy in Children. **Arch Surg**, v.140, n.9, p.905-908, 2005.

SUWA, T; CHEN, M; HAWKS, CL; HORNSBY, PJ. Zonal expression of dickkopf-3 and components of the Wnt signalling pathways in the human adrenal cortex. **J Endocrinol**, n.178, n.1 p.149-158, 2003.

SVEJGAARD, A.; JERSILD, C.; NIELSEN, L. S.; BODMER, W. F. HL-A antigens and disease. Statistical and genetical considerations. **Tissue Antigens**, v.4, n.2, p.95-105, 1974.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L.P. HLA and disease associations: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**, v.43, n.1, p.18-27, 1994.

TOBIAS-MACHADO, M.; CARTUM, J.; SANTOS-MACHADO, T. M.; GASPAR, H. A.; SIMÕES, A. S.; CRUZ, R.; RODRIGUES, R.; JULIANO, R. V.; WROCLAWSKI, E. R. Retroperitoneoscopic adrenalectomy in an infant with adrenocortical virilizing tumor. **Rev Paul Med**, v.120, n.3, p.87-89, 2002.

VAN SLOOTEN, H.; SCHABERG, A.; SMEENK, D.; MOOLENAR, A. J. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. **Cancer**, v.55, n.4, p.766-773, 1985.

WAJCHENBERG, B. L.; PEREIRA, M. A. A.; MENDONÇA, B. B.; LATRONICO, A. C.; CARNEIRO, P. C.; ALVES, V. A. F.; ZERBINI, M. C. N.; LIBERMAN, B.; GOMES, G. C.; KIRSCHNER, M. A. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. **Cancer**, v.88, n.4, p.711-736, 2000.

WEISS, L. M. Comparative study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. **Am J Surg Pathol**, v.8, n.3, p.163-169, 1984.

WEISS, L. M.; MEDEIROS, L. J.; VICKERY JR., A. L. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. **Am J Surg Pathol**, v.13, n.3, p.202-206, 1989.

WEST, A. N.; NEALE, G. A.; POUNDS, S.; FIGUEIREDO, B. C.; GALINDO, C. R.; PIANOVSKI, M. A. D.; FILHO, A. G. O.; MALKIN, D.; LALLI, E.; RIBEIRO, R.; ZAMBETTI, G. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. **Cancer Res**, v.67, n.2, p.600-608, 2007.

WEST, A. N.; RIBEIRO, R. C.; JENKINS, J.; GALINDO, C. R.; FIGUEIREDO, B. C.; KRIWACKI, R.; ZAMBETTI, G. Identification of a Novel Germ Line Variant Hotspot Mutant p53-R175L in Pediatric Adrenal Cortical Carcinoma. **Cancer Res**, v.66, n.10, p.5056-5062, 2006.

WIENEKE, J. A.; THOMPSON, L. D. R.; HEFFESS, C. S. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. **Am J Surg Pathol**, v.27, n.7, p.867-881, 2003.

WOLKERSDÖRFER, G. W.; LOHMANN, T.; MARX, C.; SCHRÖDER, S.; PFEIFFER, R.; STAHL, H. D.; SCHERBAUM, W. A.; CHROUSOS, G. P.; BORNSTEIN, S. R. Lymphocytes stimulate dehydroepiandrosterone production through direct cellular contact with adrenal zona reticularis cells: a novel mechanism of immune-endocrine interaction. **J Clin Endocrinol Metab**, v.84, n.11, p.4220-4227, 1999.

WOLKERSDÖRFER, G. W.; MARX, C.; BROWN, J.; SCHRÖDER, S.; FÜSSEL, M.; RIEBER, E. P.; KUHLISCH, E.; EHNINGER, G.; BORNSTEIN, S. R. Prevalence of HLA-DRB1 genotype and altered Fas/Fas ligand expression in adrenocortical carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v.90, n.3, p.1768-1774, 2005.

WOOLF, B. On estimating the relationship between blood group and disease. **Ann Human Genet**, v.19, b.4, p.251-253, 1955.

WOOTEN, M. D.; KING, D. K. Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. **Cancer**, v.72, n.11, p.3145–3155, 1993.

ZANCANELLA, P.; PIANOVSKI, M. A.; OLIVEIRA, B. H.; FERMAN, S.; PIOVEZAN, G. C.; LICHTVAN, L. L.; VOSS, S. Z.; STINGHEN, S. T.; CALLEFE, L. G.; PARISE, G. A.; SANTANA, M. H.; FIGUEIREDO, B. C. Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. **J Pediatr Hematol Oncol**, v.28, n.8, p.513-524, 2006.

## ANEXOS



**ANEXO 1**  
**CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA**  
**EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**



2ª VIA



Curitiba, 21 de março de 2009.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Alexandre Menna Barreto Cordeiro**  
Neste

Prezado Pesquisador:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES DO MHC (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-G, MICA E TNF) EM CRIANÇAS COM TUMOR DO CORTEX ADRENAL PORTADORAS DA MUTAÇÃO R337H NO GENE P53 E EM PARENTES ASSINTOMÁTICOS PORTADORES DA MESMA MUTAÇÃO” foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 03 de março de 2009. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

**CAAE: 0028.0.208.000-09****CEP: 1866.033/2009-02****Data para entrega do primeiro relatório: 21 de setembro de 2009.**

Atenciosamente,

**Renato Tambara Filho**

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

**ANEXO 2**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

*He*

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

a) Você está sendo convidado a participar

como paciente ( )

como familiar ( ) do estudo intitulado

"ESTUDO DO POLIMORFISMO DOS GENES DO MHC (HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1, HLA-G, MICA E TNF) EM CRIANÇAS COM TUMOR DO CÓRTEX DA ADRENAL PORTADORAS DA MUTAÇÃO R337H NO GENE TP53 E EM PARENTES SAUDÁVEIS PORTADORES DA MESMA MUTAÇÃO". É através das pesquisas, inclusive básicas, que ocorrem os avanços na Medicina, e sua participação é de fundamental importância.

b) O objetivo desta pesquisa é tentar contribuir para que ocorra um avanço na compreensão dos mecanismos genéticos e imunológicos relacionados ao tumor do córtex da adrenal. O tumor adrenal é uma neoplasia localizada em um órgão acima do rim e é responsável por alteração na produção de hormônios sexuais, entre outras consequências. Foi identificada uma mutação no DNA das crianças com tumor adrenal, sendo que a mesma alteração genética pode estar presente também em seus familiares saudáveis. Os mecanismos que determinam o surgimento do tumor em alguns indivíduos portadores da mutação no DNA e não em outros ainda não estão esclarecidos. O objetivo desta pesquisa é avaliar se existe diferença no HLA entre os indivíduos que têm mutação e desenvolvem o tumor e aqueles que têm a mesma mutação e não desenvolveram o tumor da supra-renal.

c) Caso você participe da pesquisa, será necessário apenas que você forneça uma amostra de sangue (10 ml) coletada de uma veia periférica, com seringas e agulhas esterilizadas.

d) O único inconveniente que você poderá experimentar é a dor pela picada na hora da coleta de sangue, bem como pequenos hematomas que possam vir a ocorrer, e que não causam dano.

e) O sangue coletado neste estudo será utilizado somente para a realização da avaliação do HLA e após esta pesquisa será descartado.

f) Não há riscos para você, apenas o desconforto da coleta.

g) Para tanto você deverá comparecer à UEP, para a coleta do sangue.

h) Em caso de dúvidas, o pesquisador responsável pelo projeto, Dr. Alexandre Menna Barreto Cordeiro, poderá ser encontrado na UEP (fone: 41 9917-7049).

i) Está garantido que você terá todas as informações que você queira, antes, durante e depois da pesquisa.

*Maria José Mucelin*  
**MARIA JOSÉ MUCELIN**  
 membro do Comitê de Ética em Pesquisa  
 em Função de Assessoria da UEP  
 02/09/2010

j) A sua participação neste estudo é voluntária. Você tem a liberdade de se recusar a participar da pesquisa.

k) As informações relacionadas à pesquisa poderão ser inspecionadas pelos pesquisadores que executam a pesquisa e pelas autoridades legais. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação ou por qualquer meio, isto será feito de forma codificada, para que a confidencialidade seja mantida.

l) Todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames) não são de responsabilidade dos pacientes ou familiares.

m) Pela sua participação na pesquisa, você não receberá qualquer valor em dinheiro.

n) Quando os resultados forem divulgados, não aparecerá seu nome e sim um código.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa para a qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona o fato relacionado à coleta de sangue e seus inconvenientes. Eu entendi que sou livre para interromper ou não participar da pesquisa.

Eu concordo voluntariamente em participar desta pesquisa.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente/familiar  
ou responsável

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Data

Adendo ao TCLE previamente aprovado:

1. A amostra de sangue coletada para a pesquisa será armazenada do Laboratório de Imunogenética e Histoquímica pelo prazo de cinco anos, com o objetivo de realizar todas as análises propostas.

Eu, \_\_\_\_\_ li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo da pesquisa para a qual fui convidado a participar. A explicação que recebi menciona o fato relacionado à coleta de sangue e seus inconvenientes. Eu entendi que sou livre para interromper ou não participar da pesquisa.  
Eu concordo voluntariamente em participar desta pesquisa.

Nome do Pai

Assinatura do pai

Data

Nome da Mãe

Assinatura da mãe

Data

Nome do responsável legalmente


Assinatura

Data

Nome do pesquisador ou aplicador do TCLE

Assinatura

Data

  
MÁRIA JOSÉ MOCELIN  
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa  
dos Serviços Humanários do HCU/UFPA  
Matrícula 2462